

Rolle der Prolyl-Hydroxylasen und des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems bei sepsisinduzierter Nierenschädigung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Biochemikerin Katrin Schindler
geboren am 29.01.1985 **in** Jena

Gutachter:
Prof.Dr.med. Gunter Wolf, MHBA (Jena)
Prof. Dr. rer.nat. habil. Reinhard Wetzker (Jena)
Prof. Dr.med. Ulf Panzer (Hamburg)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.11.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung	5
1.1 Sepsis	5
1.2 Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS)	6
1.3 Niere	6
1.4 Akutes Nierenversagen	7
1.5 HIF-Signalweg	9
1.5.1 MAPK-Organizer Protein 1 (MORG1)	10
1.5.2 HIF-Prolyl-Hydroxylasen und HIF-Prolyl-Hydroxylase-Inhibitoren	11
1.6 HIF in Nierenschädigung und Sepsis	12
1.7 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	13
2. Zielsetzung der Arbeit	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Geräte	16
3.1.2 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3 Kits	17
3.1.4 Primäre Antikörper	17
3.1.5 Sekundäre Antikörper	18
3.1.6 Oligonukleotide / Primer	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Tierexperimentelle Methoden	19
3.2.1.1 Versuchstiere	19
3.2.1.2 Genotypisierung	21
3.2.1.3 Versuchsablauf	21
3.2.1.4 Peritoneale Kontamination und Infektion (PCI)	22
3.2.1.5 Caecum-Ligation und -Punktion (CLP)	23
3.2.1.6 Lipopolysaccharid-Injektion (LPS)	23
3.2.1.7 PHD-Inhibitor-Injektion	24
3.2.1.8 Ramipril-Injektion	24
3.2.1.9 Angiotensin II-Behandlung	24
3.2.1.10 Clinical Severity Score (CSS)	25
3.2.1.11 Survival – Überlebenskinetik	25
3.2.2 Blutanalyse	26
3.2.2.1 Analyse des kleinen Blutbildes	26
3.2.2.2 Analyse von Nieren- und Leberparametern im Blutplasma	26
3.2.2.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Blutplasma	26
3.2.2.4 Bestimmung der VEGF-Konzentration im Blutplasma	27
3.2.2.5 Bestimmung der EPO-Konzentration im Blutplasma	28
3.2.2.6 Bestimmung der NGAL-Konzentration im Blutplasma	28
3.2.3 Urinanalyse	28

3.2.3.1	Uringewinnung	28
3.2.3.2	Albumin-Konzentrationsbestimmung im Urin	29
3.2.3.3	Kreatinin-Konzentrationsbestimmung im Urin	29
3.2.3.3	Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin	29
3.2.3.4	NGAL-Konzentrationsbestimmung im Urin	29
3.2.4	Histologische Methoden	30
3.2.4.1	PAS-Reaktion	30
3.2.4.2	Analyse der immunhistochemischen Protein-Exprimierung	30
3.2.4.3	Nachweis von Apoptose mit Hilfe der TUNEL-Färbung	31
3.2.5	Proteinbiochemische Methoden	31
3.2.5.1	Protein-Isolation aus dem Nierengewebe	31
3.2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.2.5.3	Proteinanalyse mit Hilfe des Western Blots	32
3.2.6	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.6.1	Gesamt-mRNS-Isolation aus dem Nierengewebe	33
3.2.6.2	cDNS Synthese	33
3.2.6.3	Real-Time PCR	33
3.2.7	Statistische Auswertung	34
4.	Ergebnisse	35
4.1	Einfluss von PHD-Inhibitoren bei sepsisinduzierter Nierenschädigung	35
4.1.1	Analyse der renalen Genexpression von <i>Hif-1α</i> und <i>Hif-2α</i> durch RT-PCR	35
4.1.2	Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α in der Niere	36
4.1.3	Analyse der renalen Genexpression von <i>Morg1</i> und <i>Phd3</i> durch RT-PCR	38
4.1.4	Proteinexpression von MORG1 und PHD3 in der Niere	39
4.1.5	Proteinkonzentrationen von HIF-1 α und MORG1 in der Gesamtniere	40
4.1.6	Analyse der renalen Genexpression von HIF-1 α -Zielgenen durch RT-PCR	41
4.1.7	Proteinkonzentrationen der HIF-1 α -Zielgene EPO und VEGF im Blutplasma	42
4.1.8	Inflammation und Sepsis	43
4.1.8.1	Zytokinspiegel im Blutplasma nach Sepsisinduktion	43
4.1.8.2	Zytokin-Genexpression im Blut	45
4.1.8.3	Analyse der intrarenalen <i>Tnfα</i> -Genexpression durch RT-PCR	46
4.1.8.4	TNF α -Proteinexpression im Nierengewebe	47
4.1.8.5	Sepsisbedingte T-Zellinfiltration in die Niere	48
4.1.9	Histopathologische Untersuchung des Nierengewebes	49
4.1.10	Sepsisinduzierte Apoptose im Nierengewebe	51
4.1.10.1	Detektion von renaler Apoptose mit Hilfe des TUNEL-Assays	51
4.1.10.2	Detektion des Apoptosemarkers "aktive Caspase 3"	52
4.1.11	Einfluss von PHD-Inhibitoren auf den klinischen Status nach Sepsis	53
4.1.11.1	Klinischer Schweregrad (CSS) der septischen Mäuse	53
4.1.11.2	Sepsisbedingte Gewebeschädigung	54
4.1.11.3	Störungen der Nierenretention und Nierenschädigung	55
4.1.11.4	Untersuchung des Urins zur Bestimmung von Nierenschäden	56
4.1.12	Überlebensrate	57
4.2	Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System bei sepsisinduzierter Nierenschädigung	59
4.2.1	Klinischer Schweregrad (CSS) der septischen Mäuse	59
4.2.2	Analyse des Blutbildes	60
4.2.3	Sepsisbedingte Gewebeschädigung	63

4.2.4	Nierenschädigung und Störungen der Nierenretention	63
4.2.5	Untersuchung des Urins zum Nachweis von Nierenschäden.....	65
4.2.6	Histopathologische Untersuchung des Nierengewebes.....	66
4.2.7	Sepsisinduzierte Apoptose im Nierengewebe	67
4.2.8	Einfluss von ANG II und Ramipril auf die <i>Hif-1α</i> - und <i>Hif-2α</i> -Genexpression in der septischen Niere.....	68
4.2.9	Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α in der Niere.....	69
4.2.10	Einfluss von ANG II und Ramipril auf die <i>Morg1</i> - und <i>Phd3</i> -Genexpression in der septischen Niere.....	71
4.2.11	Proteinexpression von MORG1 und PHD3 in der Niere	72
4.2.12	Einfluss von ANG II und Ramipril auf die Genexpression von HIF-1 α -Zielgenen in der septischen Niere	74
4.2.13	HIF-abhängige Konzentrationen von EPO und VEGF im Blutplasma	75
4.2.14	Inflammation und Sepsis	76
4.2.14.1	Der Einfluss von Sepsis auf die renale <i>Tnfα</i> - und <i>Il-1β</i> -Genexpression.....	76
4.2.14.2	Proteinexpression von TNF α in der Niere.....	77
4.2.14.3	Sepsisbedingte Zellinfiltration ins renale Gewebe	78
5.	Diskussion	80
5.1	Einfluss von PHD-Inhibitoren bei sepsisinduzierter Nierenschädigung	80
5.1.1	Verringerung der Degradation von HIF-1 α und HIF-2 α durch den PHD-Inhibitor	81
5.1.2	Sepsisbedingte renale HIF-1 α - und HIF-2 α -Akkumulation	82
5.1.3	Verminderung sepsisbedingter Dilatation und Apoptose im Nierengewebe durch Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α	83
5.1.4	Reduzierte Immunantwort nach Sepsis durch PHD-Inhibitor-Behandlung	84
5.1.5	Verbesserung der septischen AKI durch reduzierte TNF α -Expression in der Niere	86
5.1.6	Klinischer Status in Abhängigkeit der PHD-Inhibition nach Sepsis	87
5.1.7	Höhere Sterblichkeit im murinen Peritonitis-Modell trotz reduzierter renaler Schädigung nach PHD-Inhibitor-Behandlung	89
5.2	Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System bei sepsisinduzierter Nierenschädigung	90
5.2.1	Klinischer Status in Abhängigkeit des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System nach Sepsis	91
5.2.2	Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System auf die renale HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression	93
5.2.3	Reduzierte renale Gewebedilatation und Apoptose nach Sepsis durch den Einfluss auf das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System	94
5.2.4	Verbesserung der septischen AKI durch reduzierte renale Inflammation und T-Zellinfiltration bei allen HZ-Mäusen und WT-Mäusen mit Ramipril-Behandlung ...	96
6.	Schlussfolgerung und Ausblicke	97
7.	Literaturverzeichnis	VIII
8.	Anhang	XVI
8.1	Tabellen	XVI
8.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	XIX
8.3	Lebenslauf	XXI
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	XXIII
8.5	Danksagung	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

*	Signifikant (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
μ	Mikro
1 h	1 Stunde
3,4-DHB	3,4-Dihydroxybenzoat
ACCP	American Collage of Chest Physicians
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio
ADH	antidiuretischen Hormons
ADQI	Acute Dialysis Quality Initiative
AEC	Aminoethylcarbazol
AG	Arbeitsgruppe
AKI	Acute kidney injury (Akutes Nierenversagen)
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANG II	Angiotensin II
AP-2	Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
AST	Aspartat-Aminotransferase
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	Blutharnstoffstickstoff
CA	Californien (USA)
CBA	Cytometric Bead Array
CD3	Cluster of differentiation 3
cDNS	komplementäre DNS
CH	Schweiz
CKD	chronisches Nierenversagen
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CSCC	Center for Sepsis Control and Care
CSS	klinischer Schweregrad (clinical severity score)
Cul2	Cullin2
DE	Deutschland
DK	Dänemark
ECL-Lösung	Enhanced chemiluminescence - Lösung
Egr-1	Early growth response 1
EPO / <i>Epo</i>	Erythropoetin (Protein / <i>Gen</i> , <i>RNS</i>)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (= MAPK)

ET-1	Endothelin-1
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (geschützte Handelsmarke)
FLT-1	Fms-Related Tyrosine Kinase-1
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gen, RNS)
GBM	Glomerular basement membrane
GFR	glomerulärer Filtrationsrate
<i>Glut1</i>	Glucose transporter 1 (Gen, RNS)
<i>Gusb</i>	Beta-glucuronidase (Gen, RNS)
HIF-1 α / <i>Hif-1α</i>	Hypoxia inducible factor -1 α (Protein / Gen, RNS)
HIF-2 α / <i>Hif-2α</i>	Hypoxia inducible factor -2 α (Protein / Gen, RNS)
<i>Hprt</i>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (Gen, RNS)
HRP	Horseradish peroxidase
<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha, class B member 1 (Gen, RNS)
HZ	heterozygot <i>Morg1</i> ^{+/-}
ICU	Intensivstation
IgG	Immunglobulin G
IL-10 / <i>Il-10</i>	Interleukin 10 (Protein / Gen, RNS)
IL-1 β / <i>Il-1β</i>	Interleukin 1 β (Protein / Gen, RNS)
IL-2 / <i>Il-2</i>	Interleukin 2 (Protein / Gen, RNS)
IL-6 / <i>Il-6</i>	Interleukin 6 (Protein / Gen, RNS)
INF γ / <i>Infγ</i>	Interferon γ (Protein / Gen, RNS)
IPAS	Inhibitory PAS domain protein
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KIM III	Klinik für Innere Medizin III
KIM-1	„Kidney Injury“ Molekül-1
LDH	Laktatdehydrogenase
L-Mim	L-Mimosin
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MD	Maryland (USA)
MEK	MAPK-Kinase
M-MLV	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MORG1 / <i>Morg1</i>	MAPKinase organizer protein 1 (Protein / Gen, RNS)
MP1	MEK partner-1
mRNS	messenger RNS

n.s.	nicht signifikant
NAG	N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGAL	Neutrophilen Gelatinase assoziiertes Lipocalin
NGAL-CR	NGAL- Kreatinin-Ratio
NHE3	Sodium/Hydrogen Exchanger Isoform 3
ODDD	Oxygen-depended degradation domain
PAS-Reaktion	Periodic Acid Schiff Reaktion
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Peritoneal Contamination and Infection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-Beta	Platelet-Derived Growth Factor-Beta
PE	Phycoerythrin
PHD 1-3 / <i>Phd</i> 1-3	Prolyl-Hydroxylase 1-3 (Protein / <i>Gen</i> , <i>RNS</i>)
PHD-Inh.	Prolyl-Hydroxylase-Inhibitor
PIRO	P räposition, I nfektion, I mmun, I mmunantwort / R esponse und O rganfunktion
POD	Peroxidase
PVDF-Membranen	Polyvinylidendifluorid - Membran
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma
RIFLE	R isk, I njury, F ailure, L oss, E nd-stage renal disease
RLT-Puffer	Guanidinthiocyanat – enthaltenden Lysis-Puffers
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
SCCM	Society of Critical Care Medizin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEK	Service-Einheit-Kleinnager
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
Sp1	Specificity protein 1
Sp3	Specificity protein 3
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tbl.	Tablette
<i>Tbp</i>	TATA-box binding protein (<i>Gen</i> , <i>RNS</i>)
Th1/Th2/Th17	T-Helferzellen (Th)
TIU	Trypsin-inhibitorische Einheit (Unit)
TMB-Substrate	Tetramethylbenzidin-Substrat
TNF α / <i>Tnf</i> α	Tumor Nekrose Faktor α (Protein / <i>Gen</i> , <i>RNS</i>)
TUNEL	TdT-mediated dUTP- biotin nick end labelling

UK	Vereinigtes Königreich
UKJ	Universitätsklinikum Jena
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF / <i>Vegf</i>	Vascular Endothelial Growth Factor (Protein / <i>Gen</i> , <i>RNS</i>)
VHL	Von-Hippel-Lindau
W	Tryptophan
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Der Sepsis liegt in der Regel eine Infektion zugrunde, die zur systemisch-inflammatorischen Reaktion führt und sich bei einer Dysfunktion des endogenen Abwehr- und Reparatursystems zu einer schweren Sepsis entwickelt. Diese kann zur Hypoxie, Apoptose, Organdysfunktion sowie zum multiplen Organversagen und zum Tod des Patienten führen. Die Niere ist eines der ersten Organe, das im Verlauf der septischen Organdysfunktion betroffen ist. Die Sepsis ist eine der häufigsten Ursachen für akutes Nierenversagen (AKI). Aufgrund tierexperimenteller Daten wird der ischämische Schaden der Niere als Ursache der septischen AKI betrachtet. Dies wird verursacht durch eine massive Vasodilatation, die zur Hypotension führt, welches reaktiv durch den Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und der Aktivierung des renalen Sympathikussystems zur Erhöhung der Vasokonstriktoren, wie z.B. Angiotensin, ATP und Endothelin, führt. Der dadurch reduzierte renale Blutfluss verursacht hypoxische Schäden und akute tubuläre Nekrosen. Die genaue Rolle des Hypoxia-inducible-factor alpha (HIF- α) während der septischen AKI konnte noch nicht völlig geklärt werden. HIF-1 α spielt eine essentielle Rolle in der zellulären und systemischen Antwort auf Hypoxie. Die Regulation von HIF-1 α erfolgt hauptsächlich durch eine sauerstoffabhängige Degradation durch Prolyl-Hydroxylasen (PHD's). PHD3 formt dabei einen Komplex mit dem Gerüstprotein MAPK organizer protein 1 (MORG1), welches MORG1 in die Regulation und Stabilisation von HIF-1 α - und HIF-2 α -Proteinen involviert. Frühere Tierstudien der renalen Ischämie und Reperfusion in heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen, zeigten, dass diese Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen vor Nierenschädigungen aufgrund einer erhöhten renalen HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression partiell geschützt waren.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α durch die Inhibierung der PHD's durch 3,4-Dihydroxybenzoat möglicherweise einen positiven Einfluss auf die septische AKI hat. Dies wurde in zwei unterschiedlichen bakteriellen Sepsismodellen, der cecaligen Ligation und Punction (CLP) und der peritonealen Kontamination und Infektion (PCI) sowie die durch Lipopolysaccharide induzierte Endotoxämie in der Maus analysiert. In den Untersuchungen des Nierengewebes, 24 h nach der nicht-septischen PHD-Inhibitor Behandlung, konnte lediglich in den nicht-septischen Kontrollen nach Kontroll(sham)-CLP eine Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α gezeigt werden. Eine effiziente systemische Blockade der Aktivität der PHD's konnte aufgrund der erhöhten Vascular Endothelial Growth Factor- (VEGF-) und Erythropoietin- (EPO-) Expression im Blutplasma in allen Modellen belegt werden. Die pathophysiologischen Untersuchungen der Niere zeigten durch die PHD-Inhibitor Behandlung 24 h nach CLP und PCI reduzierte sepsisbedingte Vakuolisierung und Dilatation sowie eine Reduktion der Bürstensaummembran (brush border) der proximalen Tubuli. Die Inhibierung der PHD's reduzierte die renale Apopt-

pose nach CLP, LPS und PCI im Vergleich zu den septischen Wildtyp-Mäusen. Außerdem führte die Blockade der PHD-Aktivität zur verminderten Immunantwort nach Sepsis, vermittelt durch eine geringere $\text{TNF}\alpha$ -Expression. $\text{TNF}\alpha$, als zellulärer Schädigungsmediator, führte zur Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α und zur verbesserten septischen AKI. Jedoch führte die PHD-Inhibitorbehandlung zur höheren Sterblichkeit und zur Verschlechterung klinisch relevanter Blutplasmaparameter im murinen Peritonitis-Modell trotz reduzierter renaler Schädigung. Der systemische „pseudo“-hypoxische Zustand, der durch den PHD-Inhibitor erreicht wurde, verursachte vermutlich in anderen Organen schwerere Folgen nach der Sepsisinduktion.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss des RAAS durch Angiotensin II (ANG II) bzw. durch den Angiotensin Converting Enzyme- (ACE)-Hemmer Ramipril bei septischer AKI in den Wildtyp- und den heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen im CLP-Sepsismodell analysiert. Bislang ist wenig über die Interaktion von HIF- α und des RAAS während der sepsisinduzierten Nierenschädigung bekannt. In den heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen, sowie in den ANG II- bzw. Ramipril-behandelten Mäusen konnte 24 h nach Sepsisinduktion eine reduzierte morphologische und apoptotische Gewebeschädigung festgestellt werden. Die protektive Wirkung auf die Niere kann ebenfalls auf die reduzierte Immunantwort, mit verminderter T-Zellinfiltration und niedrigerem $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel im Nierengewebe, zurückgeführt werden. Ein erhöhtes ANG II-Niveau korreliert mit septischen Organschädigungen [Doerschug et al. 2010] und induziert die HIF-1 α -Expression [Wolf 2005]. Daher wird eine zeitliche Verschiebung der Organschädigung nach der ANG II-Behandlung, durch eine in der frühen Phase der Sepsis nützlichen Vasokonstriktion im renalen Gewebe vermutet. Trotz reduzierter septischer Nierenschädigungen mit Ramipril in beiden Mausgenotypen, wurde in diesen Mäusen eine Verschlechterung des klinischen Status, im Vergleich zu den unbehandelten septischen Kontrollen, anhand des klinischen Schweregrades und der Blutplasmaparameter beobachtet. Die ANG II-behandelten Mäuse zeigten eine renale Stabilisierung von HIF-1 α , wohingegen die Ramipril-behandelten Mäuse eine Stabilisierung von HIF-2 α in der Niere aufwiesen. HIF-2 α spielt daher vermutlich eine protektive Rolle in der sepsisinduzierten Nierenschädigung. Die renale Verbesserung der sepsisbedingten Schäden in den heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen war auf der Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α im Nierengewebe zurückzuführen. Ein nierenspezifischer Einsatz von PHD-Inhibitoren, ACE-Hemmer oder eine Reduktion von MORF1 mit einer gerichteten HIF- α -Expression könnte eine septische AKI reduzieren ohne den Gesamtorganismus negativ zu belasten.

Summary

Sepsis is a whole-body inflammatory state leading to a dysfunction of the endogenous defence and repair system. Severe sepsis contributes to hypoxia, apoptosis and multiple organ failure that could finally lead to the death of the host. The kidney is one of the first organs, which is affected by septic organ failure. Furthermore, sepsis is one of the most common causes of acute kidney injury (AKI). The ischemic injury of the kidney is considered as a cause of the septic AKI based on animal studies. The ischemic insult is characterized by massive vasodilation leading to hypotension, which reactively influences the renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) and activates the sympathetic system by increasing renal vasoconstrictor's level such as angiotensin, ATP and endothelin. This affects the renal blood flow, inducing a hypoxic injury and acute tubular necrosis. The importance of Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in sepsis related AKI has not been completely elucidated. HIF-1 α plays an essential role in cellular and systemic responses to hypoxia. Regulation of HIF-1 α occurs mainly through oxygen-dependent destruction supported by prolyl hydroxylases (PHD's). Recently, our group has shown that PHD3 forms a complex with the scaffold protein MAPK organizer protein 1 (MORG1), which links MORG1 to the regulation and stabilization of HIF-1 α and HIF-2 α proteins. Those findings were confirmed in animal models of renal ischemia/reperfusion in heterozygous *Morg1*^{+/-}-mice, which were partially protected from kidney injury compared with the wild type mice, due to increased HIF-1 α and HIF-2 α levels.

Therefore, in this thesis whether the elevated HIF-1 α and HIF-2 α due to a suppression of PHD's by 3,4 – dihydroxybenzoate (PHD-inhibitor) positively influences the septic AKI was investigated. These effects were analysed in two different models of bacterial sepsis, cecal ligation and puncture (CLP) and peritoneal contamination and infection (PCI), as well as in Lipopolysaccharides (LPS) induced endotoxemia in mice. The results revealed a stabilization of HIF-1 α and HIF-2 α only in the controls after control(sham)-CLP in renal tissue, 24 hours after non-septic PHD-inhibitor treatment. The efficiency of the systemic blockage of PHD's activity was demonstrated by an increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO) in blood plasma, due to the systemic elevation of HIF- α levels in non-septic controls of all models. The pathophysiological analysis of the kidney 24 hours after CLP and PCI unveiled less sepsis-related vacuolisation, dilatation and a "flattening" of the brush border membrane in the proximal tubules due to the PHD-inhibitor treatment. Inhibition of PHDs decreased renal apoptosis after CLP, LPS and PCI compared with the wild type septic mice. Suppression of PHDs also reduced the immune response after sepsis as found by lower TNF α levels, known as cellular damage mediator, thus improving

the septic AKI through stabilization of HIF-1 α and HIF-2 α . However, the PHD- blocking led to higher mortality and deterioration of clinically relevant plasma parameters in the mouse peritonitis models, despite reduced renal injury. The systemic "pseudo" hypoxic condition, achieved by PHD-inhibitor, probably induces more severe problems in other organs during sepsis.

Further the influence of the RAAS by angiotensin II (ANG II) or the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor Ramipril in septic AKI in wild type and heterozygous *Morg1*^{+/-}-mice were analyzed by CLP sepsis. So far little is known about the interaction of HIF- α and the RAAS during sepsis-induced renal injury. Our data shows 24 hours after sepsis a reduced morphological and apoptotic renal tissue damage in heterozygous *Morg1*^{+/-}-mice as well as in the ANG II- or Ramipril-treated mice. The protective kidney effect can also be related to the reduced immune response, attributed by reduced T-cells infiltration and lower TNF α levels in kidney tissue. An increased ANG II-level correlates with the septic degree of organ damage [Doerschug et al. 2010] and induced HIF-1 α -expression [Wolf 2005]. Therefore a temporal shift of organ injury, after ANG II treatment, is supposed due to a vasoconstriction in the renal tissue in the early phase of sepsis. Despite attenuated sepsis-associated kidney damage after Ramipril-treatment in both genotypes, the deterioration of the clinical status, compared with untreated septic controls, based on the clinical severity score and blood plasma parameters were detected. ANG II treated mice showed a renal accumulation of HIF-1 α whereas Ramipril-treated mice of HIF-2 α . Hence, HIF-2 α is believed to play a beneficial role in sepsis-induced renal injury. The renal amelioration of sepsis-induced damage in the heterozygous *Morg1*^{+/-}-mice in renal tissue is based on the stabilization of HIF-1 α and HIF-2 α .

A kidney-specific use of PHD-inhibitor, AEC-inhibitor and a reduction of MORG1, with a directional renal HIF- α expression could improve the septic AKI without a negative burden to the organism.

1. Einleitung

1.1 Sepsis

Hippokrates hat 400 v.Chr. den Begriff Sepsis als „*das Fieber das verursacht wird durch eine Materie die fault*“ und häufig zum Tod führt, geprägt [Werdan 2009]. 1914 beschrieb Hugo Schottmüller die Sepsis: „*Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden*“ [Schottmüller 1914]. Diese Definition wurde 1989 durch Bone et al. abgelöst: „*Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.*“ Damit wurde der Grundstein für das heutige Verständnis von Sepsis gelegt. Durch das American Collage of Chest Physicians (ACCP) und die Society of Critical Care Medicin (SCCM) wurde 1992 auf einer Konferenz die bis heute gültige Definition von Sepsis verfasst [ACCP/SCCM 1992]. Die Sepsis wurde in drei Schweregrade eingeteilt - Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock (**Tabelle 1**, siehe Anhang). Ergänzt wurde diese 2001 auf einer erneuten Konferenz durch das Staging-Konzept [Levy MM 2003, Wahl HG 2003, DSG], welches eine zusätzliche Schweregradeinteilung ermöglicht. Es ist bekannt als PIRO-Konzept, da es die Kriterien **P**räposition, **I**nfection, **I**mmunantwort (**R**esponse) und **O**rganfunktion berücksichtigt.

Allein in Deutschland treten 220 Sepsis-Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr auf [CSCC 2012] [Engel et al. 2007]. Das sind mehr als 150.000 Betroffene in jedem Jahr, von denen etwa 79.000 an Sepsis und 75.000 an schwerer Sepsis (septischer Schock eingeschlossen) erkranken. Es konnte gezeigt werden, dass die Krankenhausletalität der schweren Sepsis bei 54 % liegt [Bauer et al. 2006]. Die Sepsis rangiert damit auf Platz 3 der häufigsten Todesursachen nach der koronaren Herzkrankheit und dem akutem Myokardinfarkt sowie noch vor der Herzinsuffizienz in Deutschland [Engel et al. 2007, Bauer et al. 2006]. Weltweit erkranken pro Jahr ca. 1.500.000 Menschen an Sepsis, wovon 500.000 an den Folgen der Sepsis sterben [DSG e.V.]. Ursache für diese hohe Sterblichkeit sind die Fehlfunktion der körpereigenen Abwehr- und Reparatursysteme sowie die Veränderungen im Spektrum und in der Pathogenität mikrobieller Erreger [CSCC 2012]. Pathogene und ihre Produkte führen zur systemischen Wirtsantwort, die für die Entwicklung infektionsortferner Organschäden bis hin zum Multiorganversagen verantwortlich ist [Bauer et al. 2006].

1.2 Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS)

Das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) ist ein Syndrom, kein spezifisches Krankheitsbild, welches mehr als nur ein Organsystem beeinflusst [Murray und Coursin 1993]. MODS ist eine der Hauptgründe der hohen Morbidität und Sterblichkeit auf den Intensivstationen, vermutlich weil es der gemeinsame finale Weg verschiedener Krankheitsbilder ist [Murray und Coursin 1993]. Knaus et al. konnten durch das APACHE Bewertungssystem die Epidemiologie der MODS charakterisieren. Es konnten Kriterien für die Ausfälle für sechs Systeme definiert werden – für das respiratorische, das kardiovaskuläre, das renale, das hämatologische, das neurologische und das hepatische System [Knaus et al. 1991]. Diese Bewertung für die MODS wurde 1995 durch Marshall et al. überarbeitet [Marshall et al. 1995]. Aufgrund dieser Epidemiologie konnten schwere Erkrankungen bei intensivmedizinischer Versorgung, die Diagnose der Sepsis und der Infektion sowie das Alter der Patienten als Risikofaktoren mit einem MODS assoziiert werden. Im Gegensatz zur Mortalitätsrate, die bei der Dysfunktion eines Einzelorgansystems für mehr als drei Tage, bei 30-40 % liegt, erhöht sich diese beim Ausfall von zwei Organsystemen auf etwa 60 % und erreicht 90-100 % beim Ausfall von drei oder mehr Systemen. Diese Letalität ist bei Patienten über 65 Jahre um jeweils 10-20 % gesteigert [Knaus et al. 1991]. Häufig ist die Lunge das erste Organ, welches geschädigt wird. In der frühen Phase des MODS betrifft diese Systemdysfunktion oft auch die Leber, den Darm und die Nieren. Hämatologische und myokardiale Dysfunktion sind erst spät im MODS manifestiert und neurologische Folgeerkrankungen treten sowohl in der frühen als auch in späteren Phasen auf. Welche Faktoren zum MODS führen, wird kontrovers diskutiert. Hypoxie hat sich als eine wichtige Variable [Kaufman et al. 1984] herausgestellt, aber auch Faktoren wie Infektion, SIRS, Trauma und das Scheitern von Organtransplantationen, könnten zur Entwicklung dieses Syndroms beitragen. Für das MODS, als finaler Weg verschiedener Krankheitsbilder, ist kein spezifischer endogener Mediator verantwortlich, aber es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mediatoren wie Interleukine, der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), und Eikosanoide eine kritische Rolle spielen [Murray und Coursin 1993, ACCP/SCCM 1992] und diese systemische inflammatorische Antwort auslösen.

1.3 Niere

Die Niere hat vielfältige Aufgaben. Diese wichtigen Aufgaben reichen von der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und harnpflichtiger Substanzen (Entgiftung), der Bilanz des Wasserhaushaltes, der Blutdruckregulation, der Regulation des Elektrolyt- und des Säure-Base-Haushaltes über Stoffwechselfunktionen (z.B. Gluconeogenese) bis hin zur Bildung und Degradation von Hormonen. Die funktionelle Einheit der Säugerniere ist das Nephron (**Abb. 1**), bestehend aus Nierenkörperchen (malpighisches Körperchen) und Nierenkanälchen (Tubulus).

Das Nierenkörperchen besteht aus einem Kapillarnetz, dem Glomerulus, der wiederum von der Bowmanschen Kapsel umschlossen wird. Diese gehen über in den proximalen Tubulus, die Helmsche Schleife und den distalen Tubulus, der in das Sammelrohr mündet, welches Harn aus mehreren Nephronen aufnimmt (**Abb. 1**). Die Harnbildung startet im Glomerulus, von wo das unselektierte Ultrafiltrat (Wasser und gelöste Stoffe, z.B. K^+ , Na^+ , Cl^- , Glukose, Harnstoff) in den Tubulus übergeht und selektiv etwa 99 % des Wassers und die meisten Ionen, sowie die Glukose in einem aktiven Prozess reabsorbiert und toxische Stoffe in den Harn sezerniert werden. Der überbleibende Harn wird über das Sammelrohr in die Harnblase geleitet und steht dort zur Miktion bereit.

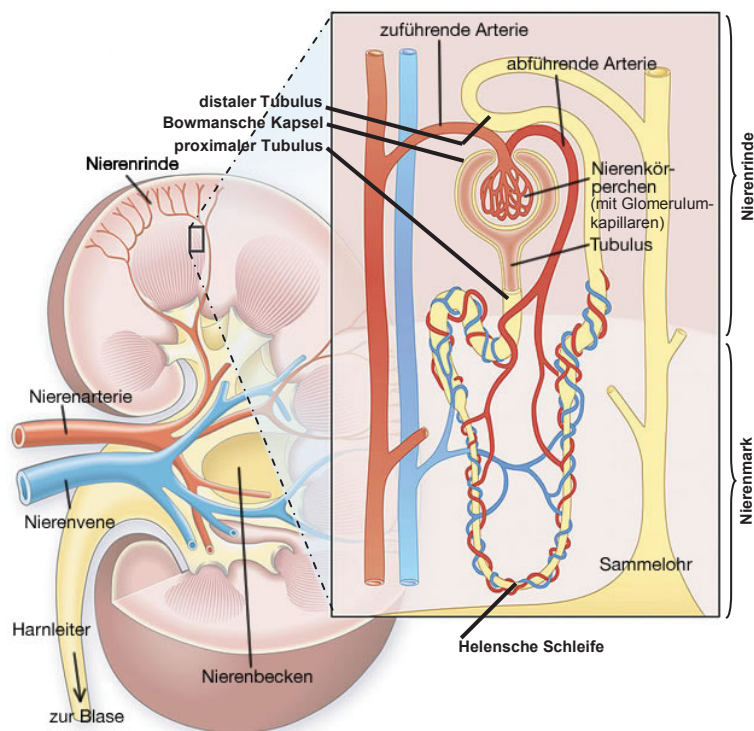


Abb. 1 Säugerniere mit funktioneller Einheit der Niere. Modifiziert nach Quelle: Apotheken Umschau „Aufbau der Niere“.

1.4 Akutes Nierenversagen

Ein akutes Nierenversagen (AKI) ist ein in nur wenigen Stunden bis Tagen einsetzender Ausfall der Nierenfunktion, welcher prinzipiell reversibel ist. Bis 2004 gab es keine einheitliche Definition des AKI, was einen Vergleich schwierig machte. Diese 30 Definitionen wurden von der RIFLE-Klassifizierung (**R**isk, **I**njury, **F**ailure, **L**oss, **E**nd-stage renal disease) der „Acute Dialysis Quality Initiative“ (ADQI) abgelöst [Bellomo et al. 2004] (**Tabelle 2**: siehe Anhang). Ursachen für das AKI können prärenal, intrarenal oder postrenal sein [Springer 2012]. Eine Minderdurchblutung/Ischämie der Niere, die zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate mit Anstieg von Harnstoff und Kreatinin führt, ist Ursache des prärenalen AKI. Bei der prärenalen AKI ist noch

keine strukturelle Änderung des Nierengewebes zu verzeichnen. Allerdings kann eine anhaltende Ischämie zur Tubulusnekrose führen. Intrarenales AKI liegt bei krankhaften Veränderungen der Glomeruli, der Tubuli und des Interstitiums vor. Beim postrenalen AKI kommt es durch Harnflussstörungen in den ableitenden Harnwegen zum Reflux mit Tubulusschädigung und Reduktion der glomerulären Filtrationsrate. Die krankheitsbedingten Ursachen des AKI können sehr vielfältig sein. Sie reichen von Nephrolithen/Harnsteinen, renaler Ischämie, Karzinomen und Nephritis bis zur Sepsis (**Tabelle 3**, siehe Anhang; [Springer 2012]). Mit 48 % ist die Sepsis Hauptursache des AKI, gefolgt von hämodynamischen (32 %), toxischen (20 %) und anderen (29 %) Gründen [Brivet et al. 1996]. In einer anderen Studie von Mehta et al. waren 28 % der AKI-Patienten durch eine Sepsis vorbelastet. Es zeigte sich aber, dass 40 % der Patienten nach AKI-Diagnose eine Sepsis entwickelten [Mehta et al. 2010]. Tritt Sepsis in Kombination mit einem AKI auf, so liegt die Mortalitätsrate bei 50-70 %. Im Gegensatz dazu liegt die Mortalitätsrate von Patienten, die nur eine AKI aufweisen, bei 20-45 % [Schrier und Wang 2004, Mehta et al. 2010]. Im Rahmen der Sepsis kann es zur Funktionsstörung mehrerer Organe kommen, bei der das AKI als Teil des Multiorganversagens eine große Rolle spielt.

Die Epidemiologie des AKI konnte in vielen Studien weltweit evaluiert werden. Eine der größten Studien wurde durch Bagshaw et al. [Bagshaw et al. 2008] auf 57 Intensivstationen (ICU's – intensive care units) in Australien durchgeführt. Ähnlich wie in der Studie von Ostermann und Chang et al., die 22 ICU's in England und Deutschland umfasste, konnte ein AKI bei 36 % der ICU-Patienten festgestellt werden. Nach der RIFLE-Klassifizierung wurden etwa 17 % mit **R** (**Risk**), etwa 12 % mit **I** (**Injury**) und etwa 7 % mit **F** (**Failure**) eingestuft [Ostermann und Chang 2007].

Es ist noch immer schwer, anhand der funktionellen Marker (Urinausscheidung und Serum-Kreatinin) die AKI zu klassifizieren – eine Erweiterung oder ein Ersetzen dieser Marker durch Schädigungsmarker wäre denkbar. Hoffnungen werden dabei auf verschiedene potenzielle Serum- und Urinmarker gesetzt. Zu diesen gehören Neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin (NGAL), „Kidney Injury“ Molekül-1 (KIM-1) [Han et al. 2002], Cystein-reiches Protein 61 [Muramatsu et al. 2002], Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase [Zahedi et al. 2003], Cystatin C [Ahlstrom et al. 2004], renales IL-18 [Parikh et al. 2004], [Parikh et al. 2005], Sodium/ Hydrogen Exchanger Isoform 3 (NHE3) [Zhou et al. 2006], N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase (NAG) [Zhou et al. 2006] und Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) [Zhou et al. 2006]. Zukünftig könnten diese Marker der zellulären Schädigung eine Diagnose des AKI noch vor der Funktionsstörung ermöglichen.

1.5 HIF-Signalweg

Ein Mechanismus zur Kompensation eines hypoxischen Zustandes, der auf verminderte Sauerstoffzufuhr bzw. erhöhten Sauerstoffbedarf von Organismen zurückzuführen ist, wird durch den Hypoxia-Inducible Factor- (HIF) Signalweg kontrolliert. Es konnten drei verschiedene HIF's identifiziert werden, die diese zelluläre Antwort regulieren und eine wichtige Rolle bei physiologischen Reaktionen, wie z.B. bei der Erythropoiese, der Angiogenese oder auch bei der Glykolyse spielen [Semenza 1998]. Diese sind HIF-1 α [Semenza et al. 1991, Semenza 1998, Goldberg et al. 1988, Semenza und Wang 1992], HIF-2 α [Ema et al. 1997, Flamme et al. 1997, Hogenesch et al. 1997, Tian et al. 1997] und HIF-3 α [Gu et al. 1998], die mit dem Kerntranslokator HIF-1 β bei Phosphorylierung einen Kerntranslokationskomplex bilden. HIF ist ein Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen reguliert (**Abb. 2**). Es sind mehr als 100 Gene bekannt, die durch HIF reguliert werden. Dazu gehören Erythropoietin (EPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Lactatdehydrogenase-A (LDH-A), Endothelin-1 (ET1), Transferrin, Transferrinrezeptor, Platelet-Derived Growth Factor-Beta (PDGF-Beta), Fms-Related Tyrosine Kinase-1 (FLT1), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und andere Gene, die die Glykolyse betreffen [Ke und Costa 2006]. HIF-1 β ist konstitutiv exprimiert, wohingegen HIF-1 α nur unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert wird. Unter Normoxie wird HIF-1 α durch Prolyl-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert, polyubiquityliert und unterläuft einer proteasomalen Degradation. Dies erfolgt über die Bindung des „Von-Hippel-Lindau-Komplexes“ (VHL) an das ubiquitylierte HIF- α , welches zusammen mit Cullin 2 (Cul2), Elongin-B, Elongin-C und Rbx1 den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex bildet (**Abb. 2**). Diese Markierung von HIF- α durch die Polyubiquitinsequenz wird von der 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt und führt durch dessen 20S-Untereinheit zum HIF- α -Abbau [Nakayama 2009].

Im Gegensatz zum ubiquitär exprimiertem HIF-1 α ist HIF-2 α in erster Linie in der Lunge, im Endothelgewebe und im Glomus caroticum vorhanden [Ema et al. 1997, Tian et al. 1997]. HIF-3 α ist in einer Reihe von Geweben exprimiert [Ke und Costa 2006], wobei dessen Splice-Variante IPAS vorwiegend in den Purkinjezellen des Cerebellums und des Kornealepithels ausgeprägt ist [Makino et al. 2001].

Unsere Arbeitsgruppe konnte ein Protein, das MAPK Organizer Protein 1 (MORG1) identifizieren, welches als molekulares Scaffold für PHD3 fungiert [Hopfer et al. 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass HIF vermittelte Reportergenaktivität durch MORG1 vermindert ist und bis hin zum basalen Aktivitätslevel absinkt, wenn MORG1 und PHD3 coexprimiert sind [Hopfer et al. 2006]. In daraufhin generierten heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen (homozygote *Morg1*^{-/-}-Mäuse sind embryonal letal) schützt die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α vor renalem AKI durch Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [Hammerschmidt et al. 2009].

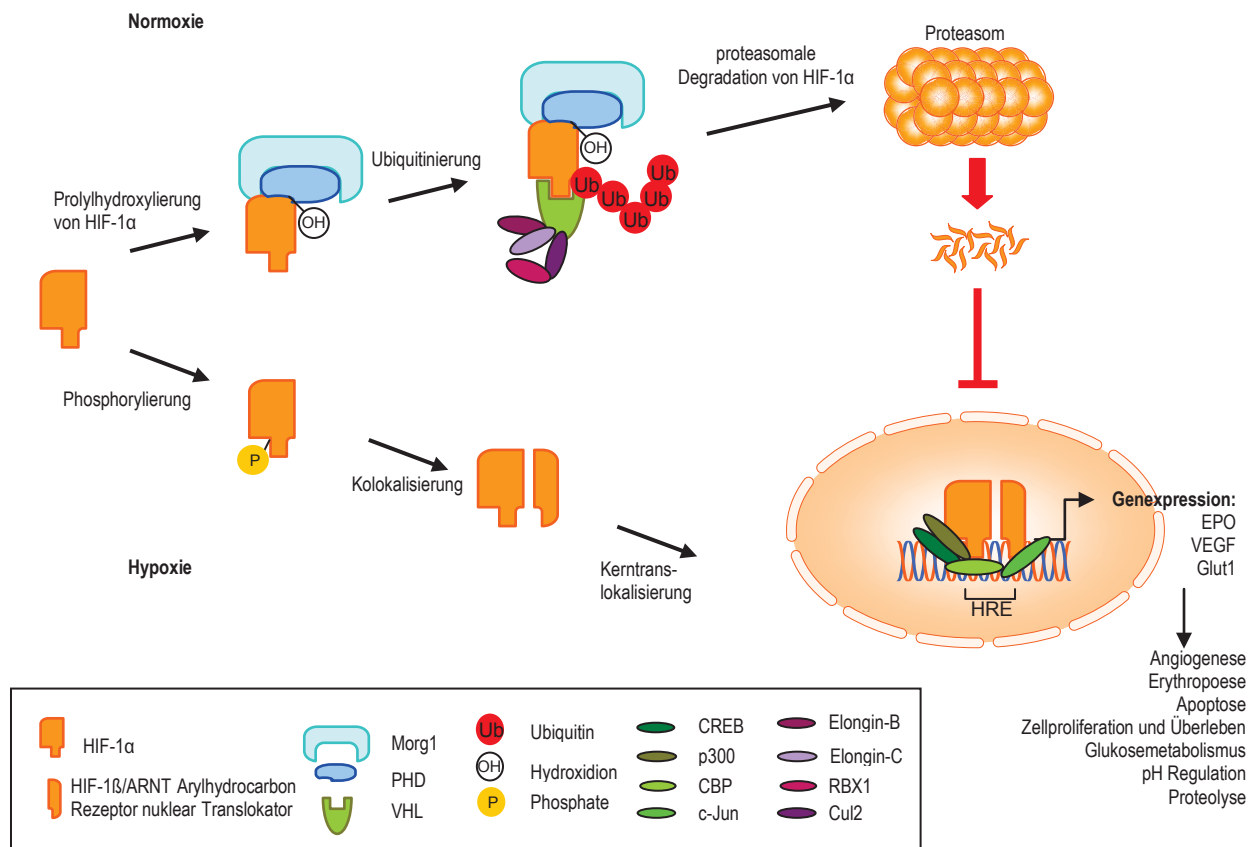


Abb. 2 HIF-1α-Signalweg. Unter Normoxie wird HIF-1α degradiert, wohingegen unter hypoxischen Bedingungen eine Kerntranslokation in den Zellkern stattfindet, durch den HIF-abhängige Gene exprimiert werden. (eigene Darstellung)

1.5.1 MAPK-Organizer Protein 1 (MORG1)

Das Mitogen Activated Protein Kinase Organizer Protein 1 (MORG1) wurde erstmals 2004 von Vomastek et al. beschrieben [Vomastek et al. 2004]. Es besitzt eine molekulare Masse von 34,5 kDa und gehört zur Familie der WD-40-„repeat“ Proteine, welches 7 Wiederholungen dieser strukturellen Tryptophan(W)/Asparagin(D)-Domänen aufweist und einer zirkulären β -Propeller-Struktur ähnelt [Hopfer et al. 2006, Smith et al. 1999, Neer et al. 1994] [Li und Roberts 2001]. Die biologische Funktion der WD-„repeat“ Proteine reicht aufgrund dieser gerüstbildenden Eigenschaft von Signaltransduktion über transkriptionale Regulation bis hin zur Apoptose und ist mit verschiedenen humanen Krankheiten assoziiert [Li und Roberts 2001]. Isoliert wurde MORG1 als Bindungspartner des „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) Pathway-Scaffold Proteins MP1 [Vomastek et al. 2004]. MORG1 ist mit verschiedenen Komponenten des ERK's assoziiert, unter anderem mit MP1, Raf-1, MEK und ERK [Vomastek et al. 2004] und es konnte durch Hopfer et al. eine Bindung zur Hypoxia-inducible Factor Prolyl-Hydroxylase 3 (PHD3) gezeigt werden [Hopfer et al. 2006]. MORG1 wird daher als molekulares Gerüst (Scaffold) für PHD3 hypothesiert [Hopfer et al. 2006]. MORG1 vermindert die Expression von HIF-1α durch die Aktivierung bzw. Stabilisierung von PHD3. *Morg1* ist ubiquitär

exprimiert, wobei sehr große Mengen des *Morg1*-Transkripts im Herzen, im Gehirn, in der Leber, in der Niere und den Testis gefunden wurden und nur kleine Mengen von *Morg1* in der Lunge, in der Milz sowie in dem Skelettmuskel [Vomastek et al. 2004]. Haase et al. zeigten im humanen ischämischen Gehirn nach einem Schlaganfall eine verminderte Expression von MORG1 [Haase et al. 2009]. Während die *Morg1*^{-/-}-Mäuse in der embryonalen Phase letal sind (unpubliziert), konnte in heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen eine geringere Schädigung des Gehirns nach cerebraler Ischämie (Schlaganfall) nachgewiesen werden [Stahr et al. 2012].

1.5.2 HIF-Prolyl-Hydroxylasen und HIF-Prolyl-Hydroxylase-Inhibitoren

In Säugern kommen drei verschiedene Isoformen der HIF-Prolyl-Hydroxylasen, auch **Prolyl-Hydroxylase-Domäne** Proteine (PHD) genannt, vor: PHD1, PHD2 und PHD3. Sie gehören zur Enzymsuperfamilie der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen [Epstein et al. 2001, Jaakkola et al. 2001, Bruick und McKnight 2001] und katalysieren die Prolin-Hydroxylierung an den Position P402 und P564 der Oxygen-dependent degradation domain (ODDD) im humanen HIF- α [Epstein et al. 2001, Ivan et al. 2001, Masson et al. 2001]. Diese zwei Prolyl-Reste sind Voraussetzung für die Interaktion mit dem „Von-Hippel-Lindau“-Faktor (VHL), der wiederum die Ubiquitinylierung von HIF- α unter Normoxie vermittelt, da VHL eine Erkennungssequenz für den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex aufweist [Epstein et al. 2001, Yu et al. 2001, Ivan et al. 2001, Masson et al. 2001]. Die Aktivität der PHD's ist sauerstoffabhängig, wobei die katalytische Aktivität PHD2 = PHD3 > PHD1 beträgt [Tuckerman et al. 2004]. Unter Hypoxie ist die Aktivität von PHD reduziert [Ginouves et al. 2008]. PHD's regulieren die Stabilität der HIF- α Proteine, die wiederum PHD2 und PHD3 in einer „feedback“ Reaktion hoch regulieren [Fong und Takeda 2008, Ginouves et al. 2008]. Im normoxischen Zustand wird HIF-1 α in erster Linie durch PHD2 kontrolliert [Berra et al. 2003], während unter Hypoxie bzw. bei Reoxygenierung PHD3 die Regulierung der HIF- α Untereinheiten übernimmt [Appelhoff et al. 2004]. Alle drei PHD's sind für die Regulierung von HIF-1 α und HIF2- α verantwortlich. Appelhoff et al. zeigten aber auch, dass PHD3 *in vitro* im Wesentlichen für die Regulierung von HIF-2 α und nicht von HIF-1 α verantwortlich ist [Appelhoff et al. 2004]. In *in vivo* Daten konnte PHD2 als kritischste Isoform identifiziert werden. Während die knock-out-Mäuse im embryonalen Stadium starben, schienen *Phd1*^{-/-}- und *Phd3*^{-/-}-Mäuse pathophysiologisch unauffällig [Takeda et al. 2006]. Erst in PHD1^{-/-}/PHD3^{-/-}-Doppel-knock-out-Mäusen wurde eine milde Erythrozytose detektiert [Takeda et al. 2008]. Im Zusammenhang mit Sepsis zeigten Kiss et al. [Kiss et al. 2012], dass vor allem PHD3 für das Überleben eine entscheidende Rolle spielt. Septische PHD3-defiziente Mäuse wiesen erhöhte Blutplasmaspiegel von proinflammatorischen Zytokinen auf sowie eine Zunahme von rekrutierten Makrophagen in den inneren Organen [Kiss et al. 2012] auf. Diese, durch die Sepsis verursachte, erhöhte Letalität war auf den

Verlust von PHD3 in den Myeloidzellen zurückzuführen. Kiss et al. schlussfolgerten, dass eine Verminderung der PHD3-Aktivität eine abdominale Sepsis eine aufgrund erhöhter HIF-1 α - und NF- κ B-vermittelten angeborenen Immunantwortsteigerung erschweren würde [Kiss et al. 2012]. Dass PHD3 essentiell bei der hypoxischen Regulation der neutrophilen Inflammation von Mensch und Maus ist, konnte auch durch Walmsley et al. dargestellt werden [Walmsley et al. 2011]. PHD3-Expression in humanen Neutrophilen war unter Hypoxie und Inflammationsstimulus stark induziert und Neutrophile von PHD3-defizienten Mäusen überlebten länger unter Hypoxie [Walmsley et al. 2011]. Unter dem systemisch verabreichten PHD-Inhibitor Ethyl-3,4-Dihydroxybenzoat (3,4-DHB) wurde eine erhöhte Konzentration von HIF-1 α in der Leber und erhöhte HIF-induzierte EPO-Konzentrationen im Serum nachgewiesen, welches zur gesteigerten Bewegungsleistung sowie zur signifikant verbesserten Viabilität unter Hypoxie führte [Kasiganesan et al. 2007]. In Studien zur Untersuchung von Effekten des systemischen nicht-selektiven PHD-Inhibitors L-Mimosin (L-Mim) im Zusammenhang mit dem chronischen Nierenversagen (CKD) zeigte sich im Rattenmodell, dass eine Gabe in der frühen Phase renale Fibrose förderte und die renale Funktion verschlimmerte. Hingegen reduzierte eine L-Mim-Behandlung in der fortgeschrittenen Phase des CKD renale Fibrose und schützte die Nierenfunktion [Yu et al. 2012]. Ersteres war vorwiegend auf die Aktivierung von HIF-1 α zurückzuführen, wohingegen das zweite Modell mit einer Aktivierung von HIF-2 α und der Hochregulation von den Zielgenen VEGF und EPO assoziiert war [Yu et al. 2012].

1.6 HIF in Nierenschädigung und Sepsis

Von vielen der Gene, die durch HIF reguliert werden, wird eine erhöhte Leistung bei reduziertem Sauerstoffangebot erwartet [Semenza 2003, Maxwell 2005]. Hill et al. konnten zeigen, dass es den HIF-1 α ^{+/-}- und HIF-2 α ^{+/-}-Mäusen nach renaler Ischämie und Reperfusion schlechter ging, was mit einer protektiven Rolle von HIF konform geht [Hill et al. 2008]. Zudem waren die Nieren der Tiere, die zur Aktivierung von HIF mit Prolyl-Hydroxylase-Inhibitoren behandelt wurden, vor renalen Ischämie- und Reperfusionsschäden geschützt [Hill et al. 2008]. Die protektive Wirkung von renal erhöhtem HIF-1 α und HIF-2 α konnte im renalen Ischämie/Reperfusion-Mausmodell durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden [Hammerschmidt et al. 2009]. Hingegen konnten Peyssonnaud et al. zeigen, dass eine HIF-1 α -Deletion in Makrophagen protektiv bei LPS-induzierter Endotoxämie wirkt [Peyssonnaud et al. 2007]. Studien von Kiss et al. bestätigten diese Tendenz im LPS- und CLP- (Cecal-Ligation and Puncture) Sepsismodell [Kiss et al. 2012]. Der Verlust der HIF Prolyl-Hydroxylase Enzyme PHD1, PHD2 und PHD3 in den jeweiligen knock-out-Mäusen, begleitet von einer HIF-Proteinstabilisierung und einer gesteigerten NF- κ B-Aktivität, erhöhte die angeborene Immunantwort auf die Sepsis. Die PHD3-defizienten Mäuse wiesen ein er-

höhtes proinflammatorisches Zytokinniveau sowie eine Infiltration von Makrophagen in den inneren Organen auf, welches so zu einer verfrühten Organdysfunktion und zur erhöhten Mortalität im Vergleich zu den Wildtypen führte [Kiss et al. 2012].

1.7 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Für die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes in Organismen ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zuständig und damit entscheidend für die Blutdruckregulation verantwortlich. Eine große physiologische Bedeutung hat die Kaskade des RAAS bei Hypovolämie sowie bei Hypotension und spielt eine pathophysiologische Rolle bei fehlerhafter Aktivierung, z.B. bei Nierenarterienstenose, Herzinsuffizienz und fortgeschrittenen Lebererkrankungen. Das Enzym Renin wird im juxtaglomerulären Apparat am Vas afferens (*Arteriola glomerularis afferens*) der Glomeruli in der Niere bei reduzierter renaler Perfusion gebildet. Dies führt in der RAAS-Kaskade zur Spaltung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens zu Angiotensin I. Durch die enzymatische Wirkung des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) wird aus Angiotensin I das Angiotensin II (ANG II) abgespalten. Die Wirkung von ANG II auf den Organismus ist sehr vielfältig. In erster Linie ist es für die Vasokonstriktion – eine Verengung der Blutgefäße – und damit für eine Blutdruckerhöhung verantwortlich. Auf diese Weise wird die Filtration in den Nierenkörperchen trotz verminderter Nierendurchblutung aufrechterhalten. Im Nierencortex wird durch ANG II Aldosteron freigesetzt, welches die Reabsorption von Natrium, eine Exkretion von Kalium und dadurch eine passive Retention von Wasser fördert. Diese Konservierung von Wasser wird durch die Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH/Vasopressin) aus der Hypophyse unterstützt und führt zu einem erhöhten Blutvolumen und schließlich ebenfalls zur Blutdrucksteigerung. ANG II führt außerdem zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Durch negative Rückkopplung wird eine Überreaktion des Systems verhindert und so wird durch ANG II sowie durch Aldosteron die Freisetzung von Renin gehemmt (**Abb. 3**) [Carey und Siragy 2003]. ANG II agiert als Haupteffektor des RAAS in Herz und Niere durch die Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren des Typ 1 (AT₁) und des Typ 2 (AT₂) und führt zur Vasokonstriktion sowie zur Kardial- und Gefäßhypertrophie, hauptsächlich über den AT₁ Rezeptor [Aros und Remuzzi 2002]. Durch ANG II konnte in vivo Experimenten gezeigt werden, dass der vaskuläre Tonus der afferenten und efferenten glomerulären Arteriolen erhöht ist und der intraglomeruläre Gefäßdruck und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) angepasst werden [Yoshioka et al. 1987]. Diese intrakapillare Hypertension und erhöhte Ultrafiltration von Plasmaproteinen tragen zum Einsetzen und Fortschreiten von chronischen Nierenerkrankungen bei [Remuzzi und Bertani 1998]. Allerdings spielen auch nicht-hämodynamische Effekte von ANG bei der Progression der renalen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Dazu gehören eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, eine

Hochregulation von Zytokinen, profibrotischen Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen (CAMs), die Induktion der Expression des Transforming Growth Factor- β (TGF- β), eine erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen sowie die Aktivierung und Infiltration von Makrophagen [Remuzzi et al. 2005, Ruiz-Ortega et al. 2001, Rüster und Wolf 2006, Wolf et al. 2003, Wolf und Wenzel 2004, Wolf 2006, Wolf 1998]. Dadurch steuert ANG II Prozesse wie Wachstum und Apoptose sowie Fibrose und Inflammation. Letztlich führt ANG II zur adrenalen Produktion des Mineralokortikoids Aldosteron, welches zu renalen und kardialen Schäden beitragen kann [Hollenberg 2004]. Während der Sepsis wird auch das RAAS aktiviert. Eine Hypotension ist charakteristisch bei schwerer Sepsis und ist mit einer Erhöhung der Herzleistung, mit einer peripheren Vasodilatation und mit Organdysfunktion assoziiert. Das RAAS wird primär zur Blutdrucksteigerung aktiviert, allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen ANG II-Spiegel und Organversagen sowie Mortalität bei Sepsis gezeigt werden [Doerschug et al. 2010]. Daher könnten RAAS-Antagonisten als Therapie eine mögliche Rolle bei schwerer Sepsis spielen [Hagiwara et al. 2009b, Hagiwara et al. 2009a, Hirano et al. 2013, Laesser et al. 2004]. Allerdings ist der Zeitpunkt bei der Verabreichung der RAAS-Antagonisten sehr wichtig, denn diese scheinen nur auf die frühe Phase der Sepsis beschränkt positiv zu sein [Salgado et al. 2010]. Es ist bekannt, dass ANG II zur Induktion von HIF-1 α führt [Wolf 2005], wobei die Rolle von HIF-1 α bei sepsisbedingten Nierenschäden bisher nicht untersucht wurde.

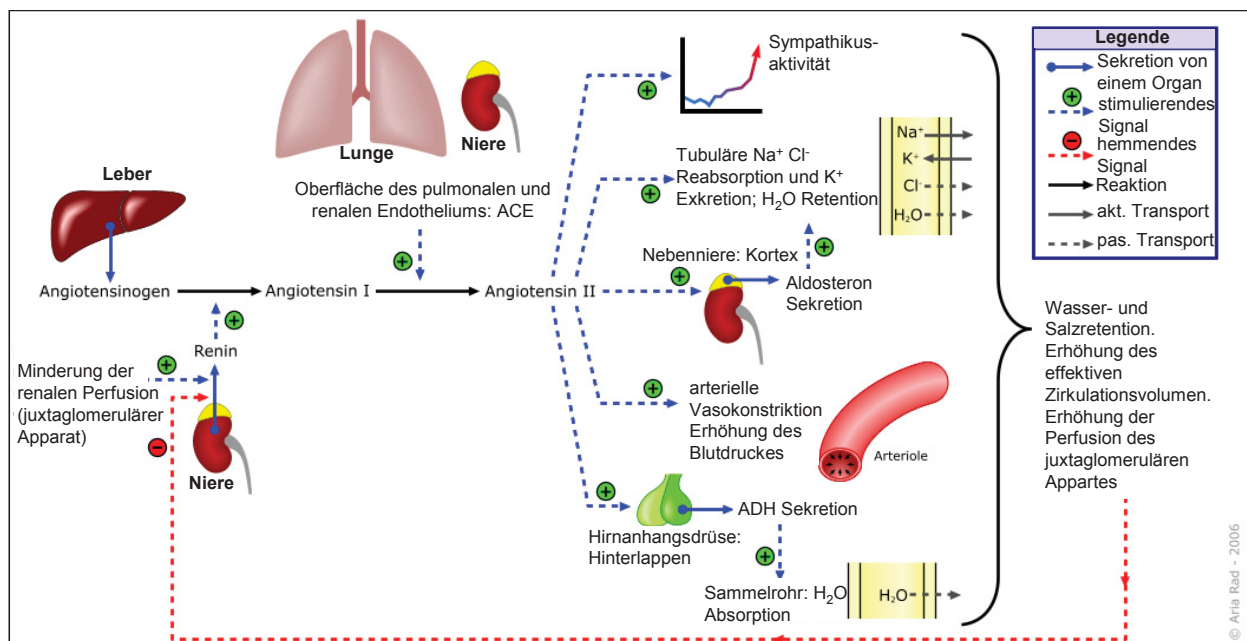


Abb. 3: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Modifiziert nach A. Rad Date (2. Februar 2006, Lizenz: GFDL durch XaraX).

2. Zielsetzung der Arbeit

Akutes Nierenversagen und präexistente Nierenerkrankungen erhöhen die Morbidität und Mortalität bei Sepsis erheblich. Eine systemisch erhöhte HIF-1 α -Expression bei Sepsis konnte bereits gezeigt werden. HIF- α wird dabei durch Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) reguliert und unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen das „MAP kinase organizer protein 1“ (MORG1) als Scaffold-Protein von PHD3 identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der PHD-Inhibierung und die Rolle des Renin-Angiotensin-Alsosteron-System (RAAS) im Zusammenhang mit der Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α im akuten Nierenversagen während der Sepsis zu untersuchen:

- Die Rolle einer verminderten PHD-Aktivität durch die Injektion von 3,4-DHB in Wildtyp-Mäusen, im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen wurde am Endotoxämiemodell – LPS sowie an zwei Sepsismodellen – CLP und PCI analysiert.
- Die systemischen Effekte durch die PHD-Hemmung in den CLP, LPS und PCI Modellen wurden durch eine 72-stündige Überlebenskinetik, durch die Bestimmung von Bilirubin und Laktatdehydrogenase im Blutplasma, des kleinen Blutbildes sowie des klinischen Schweregrades (CSS) dokumentiert.
- Die Auswirkung der Beeinflussung des RAAS bzw. die Stabilisierung der HIF's sollte im CLP-Sepsismodell untersucht werden. Da MORG1 als Scaffold-Protein von PHD3 im HIF-Signalweg involviert ist, wurden Wildtyp- und heterozygote *Morg1*^{+/-}-Mäuse, die entweder kontinuierlich ANG II über eine osmotische Pumpe oder den Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer Ramipril erhielten, analysiert.
- Die Nierenfunktion wurde in allen Behandlungsmodellen durch die Nierenretentionsmarker Kreatinin und Blutharnstoffstickstoff, dem Nierenschädigungsmarker NGAL sowie der Albumin-Kreatinin-Ratio charakterisiert.
- Die Analyse der renalen morphologischen und apoptotischen Schädigungen erfolgte mit Hilfe der PAS-Reaktion, TUNNEL-Assay sowie aktive Caspase 3-Immunhistochemie.
- Die Korrelation zwischen der PHD-Inhibitor-, der ANG II- bzw. der Ramipril-Behandlung und der HIF-1 α -/*Hif-1 α* -, HIF-2 α -/*Hif-2 α* -, PHD3-/*Phd3*- bzw. MORG1-/*Morg1*-Protein- und Genexpression wurde untersucht. Zusätzlich wurde die Protein- und Genexpression der HIF- α -Zielgene analysiert.
- Der Einfluss der PHD-Blockierung als auch der Einfluss des RAAS auf die inflammatorischen Prozesse nach Endotoxämie bzw. Sepsisinduktion wurden auf systemischer und renaler Ebene analysiert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

	Quelle
Tecan-infinite M200 mit Nano Quant plate TM (Photometer)	Tecan; Männedorf (CH)
Stoffwechselkäfige	EHRET; Emmendingen (DE)
Sysmex FDC 3500i	Sysmex Deutschland GMBH; Norderstedt (DE)
pochH-100iV Diff	scil animal care company GmbH; Viernheim (DE)
SpeedMill (Homogenisator)	Analytik Jena; Jena (DE)

3.1.2 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

	Quelle
3,4-Dihydroxybenzoesäureethylester	Sigma-Aldrich® (DE)
Ramipril	Sigma-Aldrich® (DE)
Human Angiotensin II	Sigma-Aldrich® (DE)
<i>Escherichia coli</i> LPS serotype 0111:B4	Sigma-Aldrich® (DE)
Anästhetikum + Antidot (genaue Zusammensetzung s.u.)	Versuchstierkunde: Dornburger Str. Jena (P. Dobermann)
Chirurgische Fäden Perma-Hand Seide 5-0	Ethicon; Norderstedt (DE)
Sysmex – Blutplasma/Serum Chips (Billirubin, Creatinine, LDH, ALT, AST, BUN)	Sysmex Deutschland GMBH; Norderstedt (DE)
LysisP Tubes (Homogenisator tubes für „SpeedMill“)	Analytik Jena; Jena (DE)

Lysepuffer für Proteinanalyse:

Complete Lysis M (von ROCHE; Basel (CH))

Zugabe vor Gebrauch: Proteaseinhibitoren – 1 Tbl. in 10 ml Complete Lysis M
2 mM Natriumvanadat

Transferpuffer für SDS-Page:

SDS-Puffer: 0,025 M TRIS
0,2 M Glycin
1 % SDS

Transferpuffer für Western Blot:

Anodenpuffer:
0,025 m Tris
0,04 M ε-Aminocapronsäure
20 % Methanol

Kathodenpuffer:
0,3 M Tris
20 % Methanol

Lysepuffer für RNSanalyse:

RLT-Puffer (Qiagen; Hilden (DE))

Zugabe vor Gebrauch: 100 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml RLT-Puffer

Anästhetikum + Antidot:**Anästhesie (i.p.):**

Medetomidin 0,5 mg/kg

Midazolam 5,0 mg/kg

Fentanyl 0,05 mg/kg

Antidot (s.c.):

Atipamezol 2,5 mg/kg

Flumazenil 0,5 mg/kg

Naloxon 1,2 mg/kg

3.1.3 Kits

	Quelle
RNeasy Mini Kit, Qia-Shredder	Qiagen; Hilden (DE)
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen; Hilden (DE)
NecleoSpin	Macherey Nagel; Düren (DE)
EPO-ELISA Kit (MEP00)	R&D Systems; Minneapolis (USA)
VEGF-ELISA Kit (EA-2401)	Signosis; Santa Clara (CA)
Albumin-ELISA Kit (50200)	CellTrend; Luckenwalde (DE)
Creatinine (urinary) Assay Kit (500701)	Cayman Chemical Company; Tallinn (Estland)
Reverse-Transkriptase-Kit	invitrogen TM , Darmstadt (DE)
SYBR Green Master Mix	ROCHE; Basel (CH)
Mouse NGAL ELISA Kit (Kit 042)	BIOPORTO®Diagnostics; Gentofte (DK)
BD Cytometric Bead Array-Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (560485)	BD Biosciences; Heidelberg (DE)
In Situ Cell Death Detection Kit, POD (11 684 817 910)	ROCHE; Basel (CH)

3.1.4 Primäre Antikörper

Antikörper	Eigenschaft/Herkunft	Quelle	Verdünnung	
			Western Blot	Immun-histochemie
Vinculin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich®; (DE) V9131	1:10000	
MORG1	Kaninchen, polyklonal	Biotrend	1:1000	1:1000
HIF-1α	Kaninchen, polyklonal	Abcam; Cambridge (UK) ab2185	1:500	1:100
HIF-2α	Kaninchen, polyklonal	Abcam; Cambridge (UK) ab199		1:100
TNFα	Kaninchen, polyklonal	Abcam; Cambridge (UK) ab6671		1:100
PHD3	Kaninchen, polyklonal	SantaCruz; Dallas (USA) sc-98792		1:50
Akt, Caspase 3	Kaninchen, polyklonal	Abcam; Cambridge (UK) ab4051		1:50
CD3	Kaninchen, polyklonal	DAKO; Hamburg (DE) A0452		1:75

Tabelle 4: Primäre Antikörper. Eigenschaft/Herkunft, Quelle und verwendete Verdünnung der verwendeten Antikörper.

3.1.5 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Eigenschaft/ Herkunft	Quelle	Verdünnung	
			Western Blot	Immun- histochemie
Maus-IgG-HRP	Kaninchen	KPL; Gaithersburg, MD (USA)	1:10000	1:500
Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	KPL; Gaithersburg, MD (USA)	1:10000	1:500

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper. Eigenschaft/Herkunft, Quelle und verwendete Verdünnung der verwendeten sekundären Antikörper.

3.1.6 Oligonukleotide / Primer

Primer (DNS) Genotypi- sierung	Richtung	Sequenz	Annealing- Temperatur	Amplifi- katlänge	Quelle
<i>Morg1</i>	forward	GGCAAGGGCCAGTCAGCCTGC	60°C		invitrogen™, Darmstadt (DE)
	reverse1	GATAACGAGGCAACACTTCATCCT		512 bp	
	reverse2	GCCTCTGTTCCACATACACTTCAT		300 bp	

Tabelle 6: Primersequenzen. Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Amplifikat-Länge und Quelle der verwendeten Primer für Genotypisierung

Primer (mRNS) RT-PCR		Sequenz	Annealing Temperatur	Amplifi- katlänge	Quelle
<i>Morg1</i>	forward	CCTATCACCTGCACCTGCTT	58°C	201 bp	invitrogen™, Darmstadt (DE)
	reverse	CACTTTCCCGTCTTCAGAGC			
<i>Hif-1α</i>	forward	TGAGCTTGCTCATCAGTTGCCAC	58°C	276 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	TGTCCAGTTAGTTCAAACCT- GAGTTAACC			
<i>Hif-2α</i> (<i>Epas1</i>)	forward	AAGCTCCTGTCCTCAGTCTG	58°C	315 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	CATCCTCATGAAGAAGTCAC			
<i>Vegfa</i>	forward	TCCACCAAAGGGGACGATTCCGTC	58°C	402 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	TTCTGTAACAGATGAGAT- GCTCCAAGG			
<i>Phd3</i>	forward	GAGTCAAGCAGCTC(G)CACTAC	58°C	328 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	TTCTTATTCAGGTAGTAG			
<i>Epo</i>	forward	TGCCGAACGTCACACCTGCTG	58°C	572 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	TCACCTGTCCCCTCTCCTGCAG			
<i>Tnfα</i>	forward	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCA- TTGC	58°C	300 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	ACATTTCGAGGCTCCAGTGAATT- CGG			
<i>Il-1β</i>	forward	AAGGAGAACCAAGCAACGACAAA	58°C	212 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	TGGGAACCTCTGCAGACTCAAAC			
<i>Il-2</i>	forward	TGATGGACCTACAGGAGCTCCT- GAG	58°C	168 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	GAGTCAAATCCAGAACAT- GCCGCAG			
<i>Inf-γ</i>	forward	GAAAACTCTGCAGAGCCAGA	58°C	271 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	ACTCCTTTTCCGCTTCCTGA			
<i>Hsp90ab1</i>	forward	AGATTCCACTAACCGACGCC	59°C	184 bp	TIB® MolBiol; Berlin
	reverse	CCGCACTCGCTCCACAAA			
<i>Tbp</i>	forward	CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT	59°C	131 bp	TIB® MolBiol; Berlin
	reverse	ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT			

Primer (mRNS) RT-PCR		Sequenz	Annealing Temperatur	Amplifikatlänge	Quelle
<i>Gapdh</i>	forward	TGTCAGCAATGCATCCTGCA	58°C	337 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	GATGTCATCATACTTGGCAGGTT			
<i>Hprt</i>	forward	ATCAGTCAACGGGGGACATA	58°C	185 bp	invitrogen™ Darmstadt (DE)
	reverse	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA			
<i>Gusb</i>	forward	CCGATTATCCAGAGCGAGTATG	59°C	197 bp	TIB® MolBiol; Berlin
	reverse	CTCAGCGGTGACTGGTTCG			

Tabelle 7: Primersequenzen. Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Amplifikatlänge und Quelle der verwendeten Primer für RT-PCR.

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1 Versuchstiere

Die durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt und sind als Versuchsvorhaben unter dem Aktenzeichen 02-023/10 und 02-023/11 vermerkt. Für die Versuche wurden 218 männliche Wildtyp-Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 und 54 männliche heterozygote *Morg1*^{+/-}-Mäuse der transgenetischen Linie 129/BL6 (Hintergrund C57BL/6), welche 12-16 Wochen alt waren, eingesetzt (**Tabelle 8 bis 10**). Die Mäuse wurden 4 h nach Sepsisinduktion bzw. entsprechender Scheinbehandlung einzeln 20 h in Stoffwechselkäfigen gehalten, um Urin zu sammeln. In fortführenden Experimenten zum Einfluss des RAAS wurden die Mäuse 5-6 h nach Sepsisinduktion bzw. entsprechender Scheinbehandlung einer 25 µl/g KG 0,9 %iges NaCl-Volumentherapie unterzogen und sie in ihren gewohnten Käfigen gehalten. Nach Beendigung des Versuches wurde bei den Letzteren der Spontan-Urin erfasst bzw. eine Blasenpunktion zur Uringewinnung vorgenommen. Die Versuchstiere wurden 24 h nach Sepsisinduktion unter Diethylether-Narkose durch Dekapitation und/oder Herzpunktion entblutet. Das Blut wurde in EDTA-Monovetten überführt und die Nieren für weitere Untersuchungen entnommen.

Die Tierexperimente wurden in dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der „Service-Einheit-Kleinnager“ (SEK) im Forschungszentrum Lobeda, Jena durchgeführt.

Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor	Stamm/Vorbehandlung	Zahl der Mäuse	Art des Eingriffs
CLP WT_Kontrolle	C57BL/6	9	Laparotomie
CLP WT	C57BL/6	12	CLP
CLP PHD-Inh._Kontrolle	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	9	Laparotomie
CLP PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	12	CLP
LPS WT_Kontrolle	C57BL/6	9	10 µl NaCl/g KG
LPS WT	C57BL/6	12	5 mg LPS/kg KG
LPS PHD-Inh._Kontrolle	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	9	10 µl NaCl/g KG
LPS PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	12	5 mg LPS/kg KG
PCI WT_Kontrolle	C57BL/6	= LPS WT_Kontrolle	10 µl NaCl/g KG
PCI WT	C57BL/6	12	PCI
PCI PHD-Inh._Kontrolle	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	= LPS PHD-Inh._Kontrolle	10 µl NaCl/g KG
PCI PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	12	PCI

Tabelle 8: Versuchstiere der Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor. Untersuchungsgruppe, Stamm/Vorbehandlung, Anzahl der Versuchstiere pro Tiergruppe und Art der Sepsisinduktion bzw. Kontrolle

Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor-Survival	Stamm/Vorbehandlung	Zahl der Mäuse	Art des Eingriffs
CLP WT_Kontrolle	C57BL/6	10	Laparotomie
CLP WT	C57BL/6	10	CLP
CLP PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	10	CLP
LPS WT_Kontrolle	C57BL/6	10	10 µl NaCl/g KG
LPS WT	C57BL/6	10	5 mg LPS/kg KG
LPS PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	10	5 mg LPS/kg KG
PCI WT_Kontrolle	C57BL/6	= LPS WT_Kontrolle	10 µl NaCl/g KG
PCI WT	C57BL/6	10	PCI
PCI PHD-Inh.	C57BL/6 / PHD-Inhibitor-Injektion	10	PCI

Tabelle 9: Versuchstiere der Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor-Survival. Untersuchungsgruppe, Stamm/Vorbehandlung, Anzahl der Versuchstiere pro Tiergruppe und Art der Sepsisinduktion bzw. Kontrolle

Untersuchungsgruppe RAAS	Stamm/Vorbehandlung	Zahl der Mäuse	Art des Eingriffs
CLP WT_Kontrolle	C57BL/6	8	Laparotomie
CLP WT	C57BL/6	10	CLP
CLP HZ_Kontrolle	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6	8	Laparotomie
CLP HZ	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6	10	CLP
RAAS-Inh. WT_Kontrolle	C57BL/6 / Ramipril-Injektion	8	Laparotomie
RAAS-Inh. WT	C57BL/6 / Ramipril-Injektion	10	CLP
RAAS-Inh. HZ_Kontrolle	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6 / Ramipril-Injektion	8	Laparotomie
RAAS-Inh. HZ	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6 / Ramipril-Injektion	10	CLP
ANG II WT_Kontrolle	C57BL/6 / ANG II-Pumpe	8	Laparotomie
ANG II WT	C57BL/6 / ANG II-Pumpe	10	CLP
ANG II HZ_Kontrolle	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6 / ANG II-Pumpe	8	Laparotomie
ANG II HZ	<i>Morg1</i> ^{+/-} 129/BL6 / ANG II-Pumpe	10	CLP

Tabelle 10: Versuchstiere der Untersuchungsgruppe RAAS. Untersuchungsgruppe, Stamm/Vorbehandlung, Anzahl der Versuchstiere pro Tiergruppe und Art der Sepsisinduktion bzw. Kontrolle

3.2.1.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde zunächst die genomische DNS aus den Schwanzbiopsien gewonnen. Zur Isolierung der genomischen DNS wurde ein Kit von Macherey Nagel (NucleoSpin) verwendet. Die Genotypisierung wurde mit Hilfe der Gotaq-basierender PCR durchgeführt.

3.2.1.3 Versuchsablauf

Zur Untersuchung des Einflusses von HIF-1 α , HIF-2 α und MORG1 auf das durch sepsisinduzierte Nierenversagen wurden heterozygote *Morg1*^{+/-}-Mäuse (HZ-Mäuse) (nicht Inhalt dieser Arbeit) und PHD-Inhibitor-vorbehandelte Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Mäusen (WT-Mäuse) untersucht. Diese Untersuchung fand an drei verschiedenen Sepsismodellen statt. Sepsisinduktion wurde durch Auslösen einer Peritonitis mit Hilfe einer artifiziellen polymikrobiellen Sepsis nach CLP (*Caecal Ligation and Puncture*) oder PCI-Injektion (*Peritoneal Contamination and Infection*) bzw. im engeren Sinn durch die Induktion einer Endotoxämie durch die Gabe von LPS (5 mg/kg KG) erreicht (**Abb. 4**). Entsprechende Kontrollmäuse (sham) wurden bei LPS- bzw. PCI-Behandlung mit vergleichbaren Volumenmengen 0,9 % NaCl i.p. behandelt. An den Kontrollmäusen der CLP-Behandlung wurde eine Laparotomie ohne Ligation und Punktion durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Behandlungsgruppe ist in **Tabelle 8 bis 10** angegeben. Zusätzlich wurde die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) im Verlauf der Sepsis untersucht. Dazu wurden die WT- und heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäuse mit Ramipril, einem ACE-Hemmer bzw. mit ANG II behandelt. Der Einfluss des RAAS wurde am CLP-Sepsismodell analysiert. Die Mäuse erhielten 6 h nach Sepsisinduktion eine Volumengabe von 25 μ l 0,9 % NaCl KG.

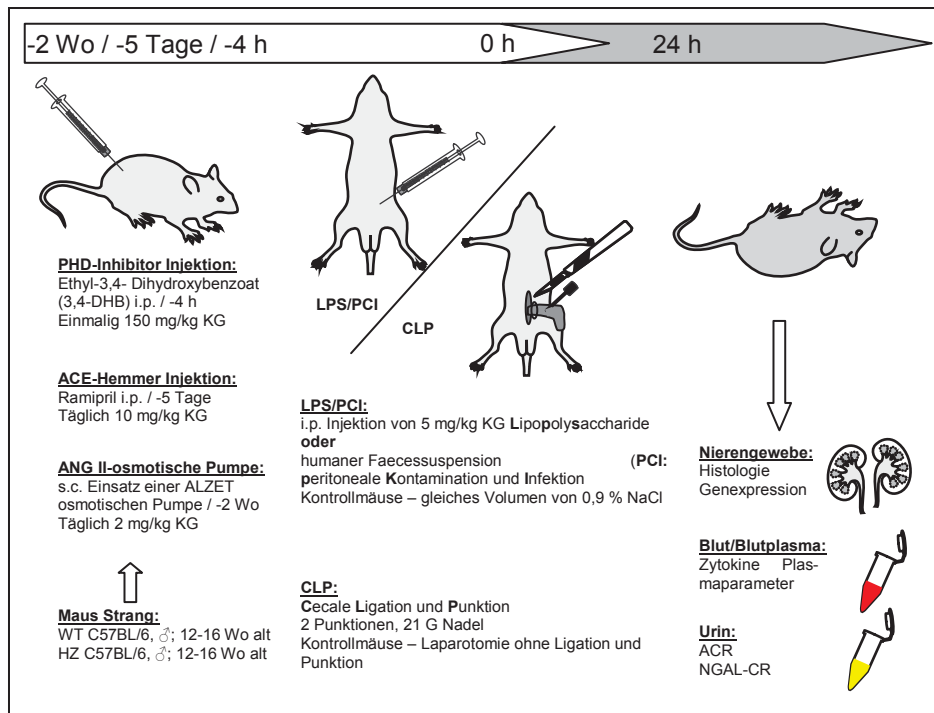


Abb. 4: Experimenteller Versuchsablauf. Zeitliche Darstellung des Tierversuches ausgehend von der Vorbehandlung der Mäuse (PHD-Inhibitor-Injektion, ACE-Hemmer-Injektion oder Implantat einer ANG II-osmotischen Pumpe), Sepsisinduktion bzw. Endotoxin-Gabe und Opferung der Mäuse zur Entnahme vom Nierengewebe, Blut/Blutplasma und Urin. (eigene Darstellung)

3.2.1.4 Peritoneale Kontamination und Infektion (PCI)

Die intraperitoneale (i.p.) Injektion einer aufgearbeiteten humanen Stuhlprobe wurde von Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena (KAI, UKJ) standardisiert durchgeführt. Dabei wurde eine Injektionsmenge der PCI-Probe von 1,5 µl/g KG i.p. gespritzt. Den sham-behandelten Kontrollmäusen wurden ein vergleichbares Volumen 0,9 %iges NaCl injiziert. Die bakterielle Zusammensetzung der PCI-Suspension ist in **Tabelle 11** aufgeführt. Das PCI-Sepsismodell wurde von Gonnert et al. innerhalb des CSCC in Jena etabliert [Gonnert et al. 2011].

Bakterien	Gram-Färbung	Keimzahl (KBE/ml)
<i>Escherichia coli</i>	gram-negativ	1,00*10 ⁸
<i>Streptococcus spp.</i>	gram-positiv	1,20*10 ⁶
<i>Enterococcus spp.</i>	gram-positiv	1,20*10 ⁶
<i>Klebsiella ssp.</i>	gram-negativ	4,00*10 ⁴
<i>Bifidobacterium ssp.</i>	gram-positiv	7,00*10 ⁹
<i>Clostridium spp.</i>	gram-positiv	3,00*10 ⁹
<i>Bacteroides spp.</i>	gram-negativ	2,10*10 ¹⁰
<i>Prevotella spp.</i>	gram-negativ	2,90*10 ⁹
Gesamtkeimzahl		3,40*10¹⁰

Tabelle 11: Mikrobiologische Untersuchung der Stuhlprobe, welche bei PCI-Injektion verwendet wurde.

3.2.1.5 Caecum-Ligation und -Punktion (CLP)

Für das Sepsismodell der CLP wurden die Versuchstiere über die i.p.-Gabe des Narkosemittels unter Narkose gesetzt. Es wurde eine „Linea Alba“-Laparotomie (**Abb. 5.1**) durchgeführt und der Blinddarm vorsichtig disloziert, um keine Blutgefäße zu verletzen (**Abb. 5.2**). Die Ligation wurde im Bereich von 2/3 des Blinddarms vorgenommen (**Abb. 5.3**). Mit einer 20 G Kanüle wurde das Caecum im abgebundenen Bereich zweimal durchstoßen (**Abb. 5.4**) und 2 Papillen der Fäces vorsichtig extrudiert (**Abb. 5.5**). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Faeces-Papillen stets das gleiche Volumen hatten, um einen vergleichbaren Sepsis-Ausgang zu erhalten. Die Bauchhöhle wurde in zwei Abschnitten durch 5-0 Perma-Seidenädeln verschlossen (**Abb. 5.6**). Nach s.c.-Gabe des Antidots wurden die Mäuse in ihre Käfige unter eine Wärmelampe zurückgesetzt. Die Versuchstiere mit einer Scheinoperation wurden der gleichen Prozedur unterzogen, allerdings ohne Ligation und Punktion des Blinddarms.

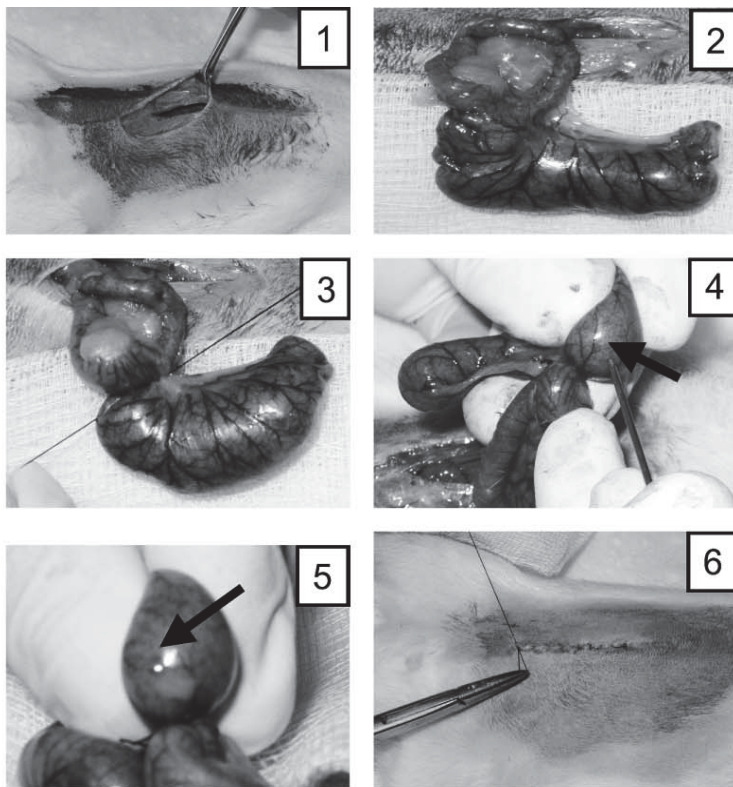


Abb. 5: CLP-Operation. Dokumentiert durch Hubbard, W.J. et al. [Hubbard et al. 2005]

3.2.1.6 Lipopolysaccharid-Injektion (LPS)

Das von der äußeren Membran gramnegativer Bakterien stammende Endotoxin LPS wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und den Versuchstieren als 5 mg/kg KG-Lösung i.p. injiziert.

Den sham-behandelten Kontrollmäusen wurde ein vergleichbares Volumen an 0,9 %iger NaCl-Lösung injiziert.

3.2.1.7 PHD-Inhibitor-Injektion

Zur Inhibierung der PHD-Funktion wurden 150 mg/kg KG des Inhibitor 3,4-Dihydroxybenzoesäureethylester (3,4-DHB) 4 h vor der Sepsisinduktion i.p. injiziert. Die Hydroxylierungsfunktion der PHD's wurde durch die Bindung von 3,4-DHB unterbunden [Warnecke et al. 2003]. 3,4-DHB wurde in 5 %igem Ethanol direkt vor der Injektion gelöst.

3.2.1.8 Ramipril-Injektion

Ramipril ist ein Inhibitor des Angiotensin Converting Enzyme (ACE). Es wird als ACE-Hemmer zur Senkung des Blutdruckes, bei Herzinsuffizienz und zur Vorbeugung von Herzinfarkt verwendet. Dabei muss das inaktive Ramipril zunächst durch die Esterasen der Leber zum Ramiprilat konvertiert werden. Die Bildung von Angiotensin II (ANG II) aus Angiotensin I wird durch die ACE-Inhibition reduziert. Diese wiederum sorgt für einen verminderten ANG II-Spiegel, welcher zur reduzierten Aldosteron-Freisetzung aus der Nebennierenrinde (*Cortex glandulae suprarenalis*) führt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Blutdruckes und des Wasserhaushalts. Ramipril führt zur Blutvolumen- und Blutdrucksenkung.

Für die Behandlung wurden den Mäusen vor der CLP-Sepsisinduktion 10 mg/kg KG Ramipril i.p. an fünf konsekutiven Tagen injiziert. Die Injektionen wurden jeweils zur gleichen Tageszeit (zwischen 9:00 und 11:00 Uhr) durchgeführt. Das Ramipril wurde in 1 mg/ml Wasser gelöst und sterilfiltriert.

3.2.1.9 Angiotensin II-Behandlung

Im Gegensatz zur Ramipril-Vorbehandlung wurde durch die ANG II-Behandlung eine Erhöhung des ANG II-Spiegels erreicht. ANG II hat eine stark vasokonstriktorische Wirkung und führt zum Anstieg des Blutdruckes und damit auch zu einer vermehrten Durchblutung sämtlicher Organe, so auch der Niere. Dort bewirkt es durch die Konstriktion der Blutgefäße eine konstante glomeruläre Filtrationsrate.

Um eine entsprechende Wirkung zu erzielen, wurden den Versuchstieren zwei Wochen vor CLP-Sepsisinduktion eine mit ANG II befüllte ALZET osmotische Minipumpe eingesetzt. Diese ALZET 2002-osmotischen Pumpen haben eine Diffusionsrate von 0,5 µl pro h und sind

auf eine 14-tägige Behandlung ausgelegt. Den Versuchstieren wurden über die Pumpe 2 mg ANG II/kg KG und Tag verabreicht. Zur Befüllung der Pumpen wurde ANG II in sterilem Wasser im Plastik-Reaktionsgefäß (da die ANG II-Lösung eine hohe Affinität zu Glas hat) gelöst und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Mit der von ALZET gelieferten Befüllungs-nadel (1cc) wurden die Pumpen befüllt. Die Pumpen benötigen 48 h Inkubationszeit, um eine korrekte Flussrate zu erreichen. Die Pumpen wurden 24 h vor Implantation befüllt und bei 37°C in NaCl-Lösung inkubiert. Zudem wurde den Mäusen eine Erholungszeit von 24 h nach der Implantation ermöglicht, bevor es zur kontrollierten ANG II-Abgabe kam. Die osmotischen Minipumpen wurden s.c. lateral implantiert.

3.2.1.10 Clinical Severity Score (CSS)

Zur Beurteilung des klinischen Schweregrades (CSS) der Sepsis wurde ein durch die AG der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena (KAI, UKJ) generiertes Bewertungssystem herangezogen (**Tabelle 12**). Die Skala reicht von 1 (= keine Anzeichen einer Erkrankung der Mäuse) über 4 (= lethargisch) bis 5 (= Tod der Mäuse). Die Bestimmung des Schweregrades fand vor, 4 h bzw. 6 h und 24 h nach Sepsisinduktion, Endotoxin-Injektion bzw. entsprechender Kontrollbehandlung (sham) statt.

Klinischer Schweregrad (CSS)				
Grad		Bewertungsmerkmale		
		spontane Aktivität	Reaktion auf exogene Stimuli	Haltung
1	kein Anzeichen einer Erkrankung	aktiv, kräftig	neugierig, schnelle Bewegungen	normal
2	schwacher Grad	vermindert aktiv, mit gelegentlichen Störungen in der Aktivität	reduzierte Wachsamkeit, aber angemessene Reaktion	leicht gekrümmt
3	mittlerer Grad	langsam, schläfrig, schwerfällige Bewegungen	limitiert und verzögert	gekrümmt
4	schwerer Grad	lethargisch, reglos, keine Bewegungen	keine Reaktion	stark gekrümmt, Buckel
5	Tod	–	–	–

Tabelle 12: Klinischer Schweregrad (CSS). Tabellarische Darstellung der klinischen Merkmale im verwendeten Bewertungssystem [Gonnert et al. 2011].

3.2.1.11 Survival – Überlebenskinetik

Um die Überlebenskinetik zwischen den WT- und PHD-Inhibitor-Mäusen zu vergleichen, wurden diese im Zeitraum von 72 h nach Sepsisinduktion, Endotoxin-Injektion bzw. entsprechender sham-Behandlung beobachtet. Das Monitoring des klinischen Schweregrades (siehe 3.2.1.10) fand für den Versuchsverlauf der Überlebenskinetik im Intervall von 4 h statt.

Die Mäuse erhielten 6 h nach Behandlung und anschließend im 12 h-Rhythmus eine Volumentherapie von 25 µl/g KG 0,9 %iges NaCl. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes wurden die Mäuse tierschutzgerecht getötet, Blut zur Blutplasmaaufreinigung entnommen. Desweiteren wurden die Organe – Niere, Leber, Milz und Lunge – entnommen und bei -80°C asserviert.

3.2.2 Blutanalyse

Das Blut wurde in den EDTA-Röhrchen gesammelt. Es wurden 20 µl Blut direkt zur Blutbildbestimmung entnommen, der Rest zentrifugiert und Blutplasma gewonnen. Zur Blutplasmagewinnung wurde die entnommene Blutmenge mit 100 µl Aprotinin (6 TIU/ml) pro ml Blut versetzt, vorsichtig vermischt und bei 4500 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert. Das Blutplasma wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

3.2.2.1 Analyse des kleinen Blutbildes

Das Blutbild wurde am Gerät pochH-100iV Diff der Firma scil animal care company GmbH gemessen. Die dafür eingesetzte Blutmenge betrug ca. 20 µl.

3.2.2.2 Analyse von Nieren- und Leberparametern im Blutplasma

Die Blutplasmakonzentration von Kreatinin, Bilirubin, Laktatdehydrogenase (LDH), Blutharnstoffstickstoff (BUN), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) wurden am Sysmex FDC 3500i-Messgerät der Firma FujiFilm bestimmt. Für die Messung wurden 10 µl Blutplasma pro Parameter eingesetzt. Für die Bestimmung von LDH wurde eine 1:10-Verdünnung mit PBS verwendet.

Für diese Messungen wurden die kolorimetrischen Slides verwendet, die aus einem mehrschichtigen analytischen Film bestehen und so Enzyme und Substrate photometrisch bestimmen.

3.2.2.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Blutplasma

Der BD™ Cytometric Bead Array (CBA) ermöglicht es, in Lösung befindliche Analyten bzw. eine Gruppe von Analyten quantitativ zu bestimmen.

Die Methode beruht auf der Bindung der Analyten an Beads gekoppelte spezifische Antikörper. Das Detektionsreagent, ein Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper, emittiert ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zum gebundenen Analyten ist. Im Falle des spezifisch bindenden Analyten, entsteht ein „Sandwich“-Komplex aus Capture Bead, Analyt und Detektionsreagenz. Dieser Komplex wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Es wurde ein CBA-Assay zur gleichzeitigen Detektion von IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A und IL-10 Protein verwendet (BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit). Für jedes neu begonnene Kit wurde ein Setup mit den Zytometer Setup Beads durchgeführt. Die durchflusszytometrische Messung wurde mit der entsprechenden Maske (etabliert durch Dr. Maik Soßdorf, AG Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, UKJ) am Durchflusszytometer zur Kontrolle des Kits durchgeführt. Blutplasma von septischen und nicht-septischen Mäusen wurde, 1:10 mit Assay Diluent verdünnt, eingesetzt. Die konzentrierten Capture Beads wurden mit Probe, Negativkontrolle und Standard vorsichtig in die FACS Röhrchen mit der Pipette resuspendiert, mit PE Detection Reagents versetzt und 2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben gewaschen in Waschpuffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die Messung wurde am FACS der Firma BD Bioscience durchgeführt.

3.2.2.4 Bestimmung der VEGF-Konzentration im Blutplasma

Die Proteinkonzentration von VEGF im Blutplasma wurde durch einen „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ermittelt. ELISA ist ein antikörperbasierendes Nachweisverfahren für die Konzentrationsbestimmung eines nachzuweisenden Stoffes, wie Proteine oder auch niedermolekulare Verbindungen wie Antikörper, mit Hilfe der enzymatischen Farbreaktion. Dafür wird die Bindung eines spezifischen Antikörpers an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) genutzt. Der Antikörper ist zusätzlich mit einem Enzym markiert, der bei entsprechender Bindung an das Antigen einen Farbumschlag katalysiert. Die Absorption wurde am Tecan - infinite M200 Mikroplattenleser gemessen. Die Proteinkonzentration wurde quantitativ ermittelt, da diese eine Funktion der Absorption ist.

Für den VEGF-Assay wurde ein ELISA-Kit von Signosis verwendet, welches ein Nachweis von VEGF auf anti-mouse-VEGF-Antikörper beschichtetem Well ermöglicht. Über einen Biotin-markierten rabbit anti-mouse VEGF Antikörper und Inkubation mit einem Streptavidin-HRP Konjugat konnte die Farbentwicklung mit Hilfe des beigefügten Farbsubstrates beobachtet werden. Die Absorption wurde am Tecan - infinite M200 bei einer Wellenlänge von 450 nm ohne Referenzwellenlänge gemessen. Die VEGF-Konzentration der Proben wurde anhand eines auf jeder neuen ELISA-Platte mitgeführten Standards bestimmt.

3.2.2.5 Bestimmung der EPO-Konzentration im Blutplasma

Die Konzentration von EPO wurde ebenfalls mit dem ELISA-Verfahren bestimmt. In dem verwendeten Kit von R&D Systems wurde die EPO-Konzentration mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen EPO beschichteten Wells und einem beigefügten mouse-EPO-Konjugat bestimmt. Gemessen wurde die Absorption der Substratlösung am Tecan - infinite M200 bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm. Die EPO-Konzentration der Proben wurde anhand eines auf jeder neuen ELISA-Platte mitgeführten Standards bestimmt.

3.2.2.6 Bestimmung der NGAL-Konzentration im Blutplasma

Mit Hilfe des mouse NGAL ELISA Kits von BIOPORTO® Diagnostics wurde die Blutplasmakonzentration von NGAL in den Versuchstieren bestimmt. Dazu wurden die Proben der nicht-septischen Mäuse 1:1000 und der septischen Mäuse 1:10.000 verdünnt. Die mit mouse NGAL-Antikörper beschichtete Mikrowell-Platte wurde mit den Proben und anschließend mit biotinyliertem mouse NGAL-Antikörper und HRP-Streptavidin inkubiert. Die Farbentwicklung durch das TMB-Substrat wurde bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm am Tecan - infinite M200 gemessen. Anhand eines auf jeder neuen ELISA-Platte mitgeführten Standards wurde die NGAL-Konzentration der Proben bestimmt.

3.2.3 Urinanalyse

3.2.3.1 Uringewinnung

Den Mäusen zur Untersuchung des PHD-Inhibitors wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben nach Sepsisinduktion in Stoffwechselkäfige transferiert: Es konnte der Urin über 20 h separat gesammelt werden. Da septische Mäuse zumeist eine Anurie aufwiesen, wurde im Versuchsteil zur Untersuchung des RAAS auf die Bestimmung des 24 h Urins verzichtet. Bei diesen Mäusen wurde der Spontan-Urin gesammelt bzw. Urin über eine Blasenpunktion gewonnen. Bereits Holly M.K. et al. [Holly et al. 2006] konnten zeigen, dass im Sepsismodell bei Ratten die in Stoffwechselkäfigen gehalten wurden, die Überlebensrate im Vergleich zur Haltung in normalen Käfigen erniedrig war. Dies ist auf den erheblichen Stressfaktor der Haltung der Mäuse in diesen Stoffwechselkäfigen und die zusätzlich Unterkühlung der Mäuse zurückzuführen. Bis zur Untersuchung wurde der Urin bei -80°C gelagert.

3.2.3.2 Albumin-Konzentrationsbestimmung im Urin

Zur Bestimmung der Albumin-Konzentration im Urin, wurde ein Albumin Festphasen-Enzymimmunoassay von CellTrend verwendet. Dies ist ein direkt kompetitiver Test, bei dem die Mikrowell-Platte mit Maus-Albumin beschichtet ist. Das in der Probe befindliche Albumin hemmt kompetitiv die Bindung des anti-Maus-Albumin-Antikörpers. Nach Abschluss der Immunreaktion wird der nicht an der Platte gebundene Antikörper entfernt und der gebundene Anteil kann durch eine Substrat-Chromogen-Lösung quantifiziert werden. Die Messung der optischen Dichte wurde im Tecan - infinite M200 bei 650 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm durchgeführt.

3.2.3.3 Kreatinin-Konzentrationsbestimmung im Urin

Der Cayman's Creatinine (urinary) Assay zur Bestimmung des Harn-Kreatinins beruht auf der Jaffé-Reaktion, wo Pikrinsäure im alkalischen Milieu nach Kreatininzugabe eine gelb/orange Färbung entwickelt. Diese Färbung geht im sauren pH-Bereich verloren. Die Differenz dieser Absorptionsintensitäten, gemessen bei 490-500 nm, ist proportional zur Kreatininkonzentration. Für den Assay wurde ein Kit der Firma Cayman Chemical Company verwendet, für welchen die Harnproben 1:20 verdünnt wurden. Die Initialabsorption und die Finalabsorption wurden bei 495 nm im Tecan - infinite M200 gemessen. Anhand eines mitgeführten Standards wurde die Kreatinin-Konzentration der Proben bestimmt.

3.2.3.3 Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin

Zur Bestimmung einer pathologischen Kreatininkonzentration im Harn ist eine Konzentrationskorrektur durch die Bestimmung des Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin nötig.

$$\frac{\text{Albumin (mg/dl)}}{\text{Kreatinin (g/dl)}} = \text{ACR (mg/g)}$$

3.2.3.4 NGAL-Konzentrationsbestimmung im Urin

Die NGAL-Konzentration im Urin wurde wie NGAL im Blutplasma bestimmt (siehe 3.2.2.6).

3.2.4 Histologische Methoden

Zur Untersuchung des Nierengewebes wurde die Hälfte der rechten Niere über Nacht in 5 %igem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die paraffinierten Nieren wurden in 5 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom geschnitten. Vor den histologischen Färbungen wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C inkubiert und mit Hilfe der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert.

3.2.4.1 PAS-Reaktion

Die PAS-Reaktion (Perjodsäure Schiffs Reaktion) wird zum histologischen Nachweis von Glykolgruppen in Gewebeproben eingesetzt. PAS zeichnet die Basallamina des Glomerulus (GBM), die Baumann'sche Kapsel sowie die Bürstensaummembran (brush border) in den proximalen Tubuli scharf ab. Morphologische Änderungen der GBM und der tubulären Bürstensaummembran sind durch PAS detektierbar. Das Prinzip der PAS-Reaktion beruht auf der Oxidation freier 1,2-Glykolgruppen zu Aldehydgruppen durch Perjodsäure. Die Aldehydgruppen werden durch die fuchsinschweflige Säure (Schiffsch Reagenz) rot gefärbt. Für die PAS-Reaktion wurden Reagenzien der Firma Roth verwendet. Eine Gegenfärbung der Kerne fand mit Hämalalaunlösung nach Mayer statt [Mayer 1891]. Nach Entwässerung der Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Proben mit Histofluid (Roti®-Histokitt) eingedeckelt. Die Analyse fand am Zeiss AxioPLAN Mikroskop statt. Es wurden 10 repräsentative Bilder jedes Nierengewebes mit Hilfe von AxioVision aufgenommen und ausgewertet.

3.2.4.2 Analyse der immunhistochemischen Protein-Expriemierung

Immunhistochemie findet in der Histologie Verwendung, um Proteine oder andere Strukturen in Geweben, Kompartimenten bzw. Zellen nachzuweisen. Die Methode beruht auf der Affinität von Antikörpern an ein spezifisches Epitop, z.B. Proteine. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion wird an ein Detektionssystem gekoppelt und macht Proteine sichtbar. Die Nierenbiopsieschnitte wurden, wie in 3.2.4 beschrieben, vorbereitet. Zur „Antigenfreilegung“ wurden die Schnitte 20 min in Citratpuffer bei 600 Watt in der Mikrowelle behandelt. Die abgekühlten Schnitte wurden mit 3 %igem H₂O₂ behandelt, um die endogene Peroxidase zu blockieren und anschließend in 1 %igem Ziegenerum/Blockpuffer (aus dem Vectastain-Kit) blockiert. Die primären Antikörper (Verdünnung je Antikörper siehe Material) wurden im Blockpuffer eingesetzt und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit einem 1:500 verdünnten, entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper behandelt. Zur Visualisierung der Antikörper-gekoppelten Pro-

teine wurde das Färbesubstrat Aminoethylcarbazol (AEC) verwendet. Die Präparate wurden mit Kaisers Gelantine eingedeckelt. Auf die Hämalaun-Kerngegenfärbung wurde verzichtet, um eine mögliche Kernlokalisierung der untersuchten Proteine zu detektieren (Ausnahme CD3-Färbung). Die Analyse fand am Zeiss AxioPLAN Mikroskop statt. Es wurden 10 repräsentative Bilder jedes Nierengewebes mit Hilfe von AxioVision aufgenommen und ausgewertet.

3.2.4.3 Nachweis von Apoptose mit Hilfe der TUNEL-Färbung

Um Apoptose im Gewebe nachzuweisen, wurde eine TUNEL-Färbung (*IdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine immunhistochemische Detektion und Quantifizierung der Apoptose durch DNS-Strangbruch-Markierung. Die Nierenschnitte wurden wie in 3.2.4.2 bis zur „Antigen-Freilegung“ behandelt. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte mit 0,1 %igem Triton-X100 in Citratpuffer inkubiert. Die TUNEL-Reaktion wurde nach dem „In Situ Cell Death Detection Kit, POD“ von Roche durchgeführt, zur Detektion wurde AEC-Substrat genutzt. Die Analyse fand am Zeiss AxioPLAN Mikroskop statt. Es wurden 6 repräsentative Bilder jedes Nierengewebes mit Hilfe von AxioVision aufgenommen. Zur Auswertung wurden von jedem Bild 10 glomeruläre und 10 tubuläre Zellkerne mit Hilfe der Software ImageJ auf ihren Grauwert untersucht und ausgewertet.

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 Protein-Isolation aus dem Nierengewebe

Zur Isolation der Proteine aus dem Nierengewebe wurde $\frac{1}{4}$ der rechten Niere mit 600 μ l Complete Lyse-M Puffer in Lysis Tubes überführt. Diese Lysis Tubes (P) waren mit 2,4-2,6 mm großen Keramik-Beads befüllt und führten zum Aufschluss des Gewebes im Homogenisator „SpeedMill“ von Analytik Jena. Die Proben wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach 10-20 min Lyse auf Eis für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Aufgrund der Bindung von SDS an die Proteine und die daraus folgende Denaturierung und negative Nettoladung der Proteine wird die Trennung im Polyacrylamidgel lediglich vom Mo-

lekulargewicht bestimmt. Die Proben wurden mit 5 x Probenpuffer bei 95°C 5 min denaturiert. Zur elektrophoretischen Separation der Proteine wurden 10 %-ige oder 12,5 %ige Polyacrylamid-Trenngele mit einem 4 %-igen Sammelgel verwendet. Nach dem Beladen der Gele wurden die Proteine elektrophoretisch bei 35 mA je Gel getrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus Protein Standard (Bio-rad) verwendet.

3.2.5.3 Proteinanalyse mit Hilfe des Western Blots

Die getrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens auf die PVDF-Membranen übertragen. Dazu musste die Membran mit Methanol benetzt und 15 min im Kathoden-Puffer inkubiert werden. Die Polyacrylamidgele wurden 15 min im Kathoden-Puffer inkubiert. Die Blot- und 3 MM-Whatmanpapiere wurden mit Transferpuffer (Kathoden- bzw. Anoden-Puffer) befeuchtet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 18 V 1 h (**Abb. 6**).

Die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als erstes wurden unspezifische Proteinbindstellen für eine Stunde in 3 % BSA-PBS-Tween-Lösung geblockt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Ungebundene Antikörper wurden in einem Waschschrift 3-mal 5 min mit 1-fachem PBS-Tween entfernt, bevor die Membran mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase/HRP) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach diesem Schritt wurden ebenfalls ungebundene Antikörper durch 3-mal 5-minütiges Waschen entfernt. Die Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenz erfolgte nach 1-minütiger Inkubation der Membran in ECL-Lösung im Chemiluminometer LAS-3000. Zur Quantifizierung der Signale wurde das Programm MultiGauge verwendet. Die Bestimmung der Proteinexpression fand relativ zu Vinculin statt. Zur Analyse anderer Proteine auf derselben Membran wurden die gebundenen Antikörper mit Strip-Puffer 30-60 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln entfernt. Zur Entfernung des Strip-Puffers wurde die Membran mit 1-fachem PBS-Tween gewaschen.

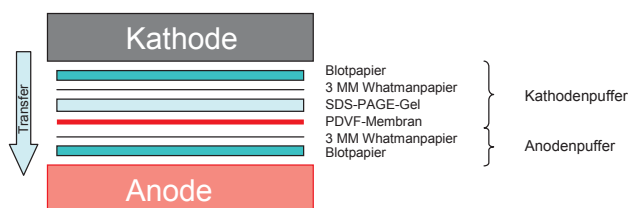


Abb. 6: Semi-Dry Western Blot. Aufbau des Semi-Dry Western Blots.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

3.2.6.1 Gesamt-mRNS-Isolation aus dem Nierengewebe

Zur Isolation der Gesamt-mRNS aus dem Nierengewebe wurde $\frac{1}{4}$ der rechten Niere mit RNS-Lysepuffer in Lysis Tubes überführt und das Gewebe im Homogenisator aufgeschlossen. Die Proben wurden mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits aufgereinigt. Die Lagerung der RNS bis zum Gebrauch fand bei -80°C statt. Die Messung der Gesamt-RNS-Konzentration fand am Tecan-Photometer mit der „Nano Quant plate“ bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm und 280 nm statt.

3.2.6.2 cDNS Synthese

Die zur einzelsträngigen mRNS komplementäre cDNS wurde mit Hilfe der reverser Transkription hergestellt. Dazu wurde ein cDNS Synthese Kit von Invitrogen® unter Verwendung von RNAsin Plus von Promega verwendet. Durch die M-MLV reverse Transkriptase wurde 1 µg mRNS zu cDNS umgeschrieben. Die mRNS wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 1,25 µg oligo dT, 25 mM dNTP und ddH₂O eingesetzt. Nach 5 min Inkubation bei 65°C wurden 10 µl 5 x Firststrand-Buffer, 5 µl 0,5 M DTT und 2,5 µl RNAsin Plus zu der Probe zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 500 U M-MLV-Reverse Transkriptase erfolgte 1 h bei 37°C und zuletzt wurde das Enzym bei 75°C 10 min inaktiviert.

3.2.6.3 Real-Time PCR

Durch Real-Time PCR kann die Expression eines Gens bestimmt werden. Diese beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), kann aber in Echtzeit durch Fluoreszenzmessung die Menge des entstandenen PCR-Fragmentes während jedes PCR-Zyklus messen. Über den threshold der entstandenen Fluoreszenzkurve kann dann ein Ct-Wert abgelesen und die Expressionsstärke eines Gens im Vergleich zu einem Referenzgen bestimmt werden. Über den ΔCt -Wert sind vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNS möglich. Zur Fluoreszenzmessung der Real-Time PCR wurde SYBR Green verwendet. Die Real-Time PCR lief nach dem in **Abb. 7** angeführten Protokoll mit den jeweiligen Annealing Temperaturen der Primerpaare. Die Auswertung der Real-Time PCR fand mit 5 Referenzgenen (Gapdh, Gusb, TbpP, Hprt und Hsp90ab1) [Vandesompele et al. 2002] statt. Die Berechnung der Ratio fand mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode statt [Livak und Schmittgen 2001]:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (control - treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (control - treated)}}} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Das verwendete Real-Time PCR Protokoll wurde in **Abb.7** dargestellt.

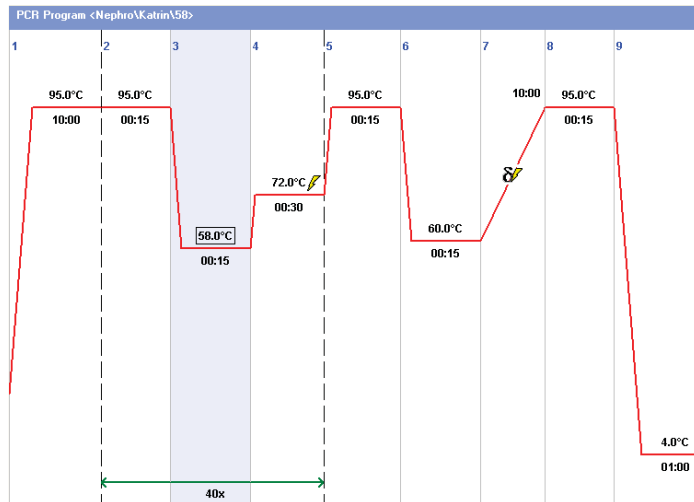


Abb. 7: Real-Time PCR Protokoll. 1: Initiale Denaturierung und Polymerase-Aktivierung; 2: Denaturierung; 3: Annealing; 4: Elongation (die Amplifikation (2-4) wurden in 40 Zyklen durchgeführt); 5-8: Erzeugung der Schmelzkurve 9: Cooling. (eigene Darstellung)

3.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die arithmetischen bzw. geometrischen (bei RT-PCR Auswertung) Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Survival-Überlebensstudien wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier analysiert. Die statistische Überprüfung der anderen Ergebnisse erfolgt mit dem Kruskal-Wallis-Test und – wenn erforderlich – gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test in SigmaPlot12, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) angesetzt wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von PHD-Inhibitoren bei sepsisinduzierter Nierenschädigung

4.1.1 Analyse der renalen Genexpression von *Hif-1 α* und *Hif-2 α* durch RT-PCR

Die Analyse der Expression von *Hif-1 α* und *Hif-2 α* sollte die Auswirkung der Blockierung der PHD-Aktivität vor und nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxämie im Nierengewebe untersuchen.

Die Hemmung der PHD-Aktivität durch 3,4-DHB führte zur deutlich reduzierten basalen Genexpression von *Hif-1 α* und *Hif-2 α* , mit Ausnahme von *Hif-2 α* nach der Scheinoperation, im Vergleich zu den nicht-septischen Kontrollen (**Abb. 8A und 8B**). Nach CLP, LPS und PCI wurde in beiden Mausmodellen eine Hochregulation der *Hif-1 α* -mRNS, verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen, detektiert (**Abb. 8A**). Durch die Inhibierung der PHD-Aktivität wurde in der Mausniere eine signifikant niedrigere *Hif-1 α* -Expression nach CLP (*p<0,05) und LPS (*p<0,05), im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen bestimmt (**Abb. 8A**). Die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse wiesen nach PCI eine tendenziell höhere *Hif-1 α* -Expression gegenüber den WT-Mäusen nach PCI auf (**Abb. 8A**). Die Genexpression von *Hif-2 α* nach CLP, LPS und PCI unterschied sich erheblich zu der *Hif-1 α* -Expression. Nach CLP wurde in beiden Mausmodellen eine Reduktion von *Hif-2 α* verzeichnet (**Abb. 8B**). Im Endotoxämiemodell wurde eine leicht erhöhte *Hif-2 α* -Expressierung in beiden Versuchsgruppen nachgewiesen (**Abb. 8B**), wobei in den Nieren der nicht-septischen und septischen Mäuse mit PHD-Inibierung eine niedrigere *Hif-2 α* -Expressierung als bei den WT-Mäusen beobachtet wurde. Die Sepsisinduktion durch PCI führte 24 h nach der Behandlung in den WT-Mäusen ohne und mit PHD-Hemmung zu keiner signifikanten Änderung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollmäusen (**Abb. 8B**).

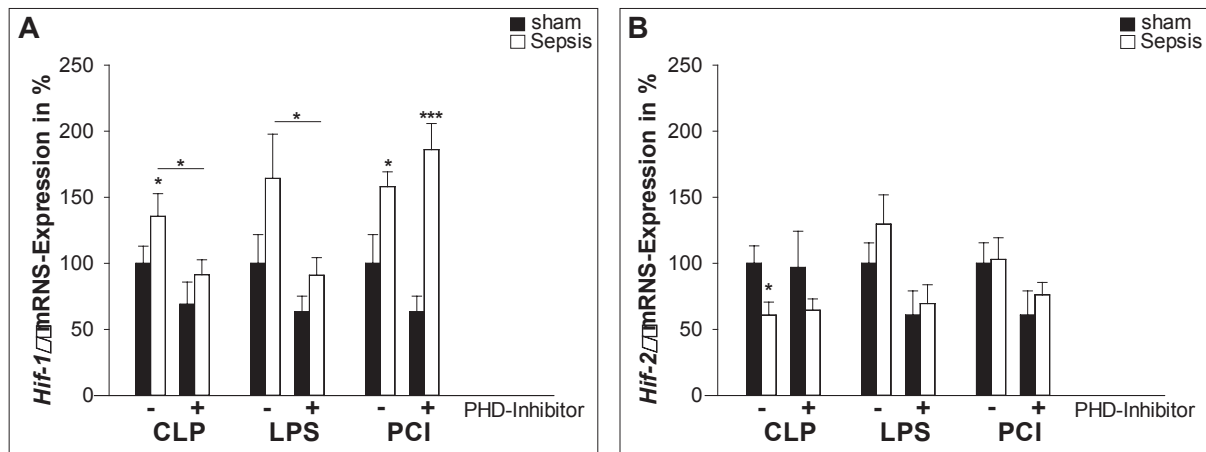
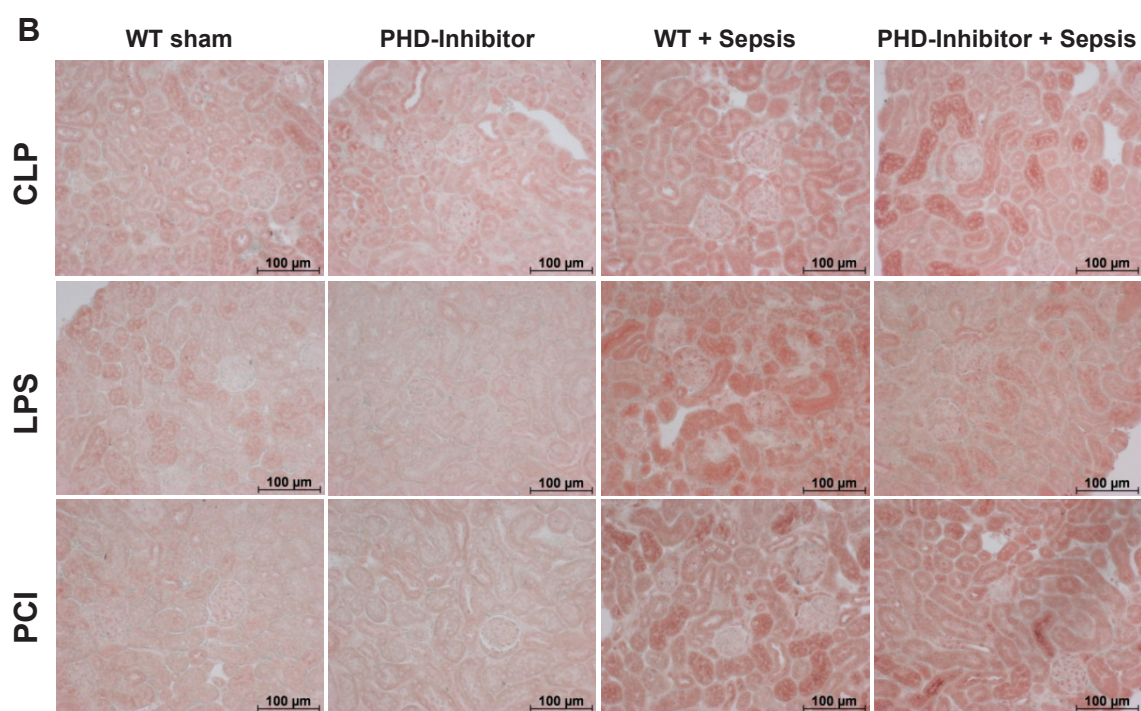
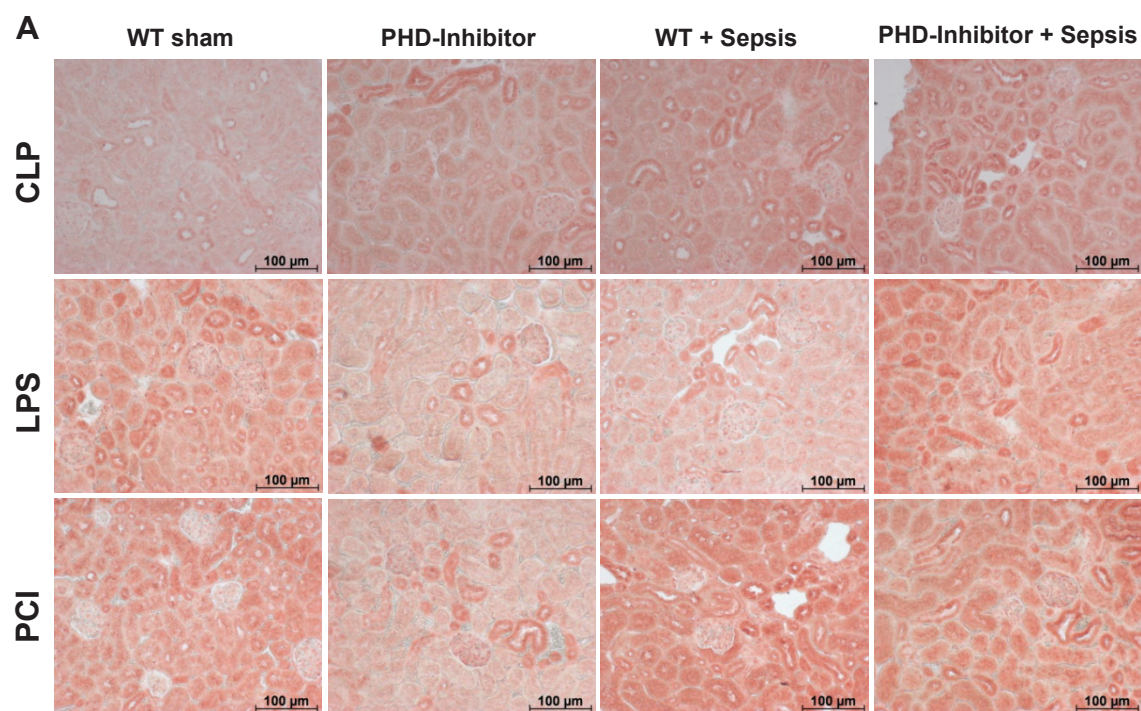


Abb. 8: *Hif-1α*- und *Hif-2α*-Genexpression. Der Genexpressionsspiegel von (A) *Hif-1α* und (B) *Hif-2α* wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen verglichen. n=9-12.

4.1.2 Proteinexpression von HIF-1α und HIF-2α in der Niere

Durch die Bestimmung der HIF-1α- und HIF-2α-Proteinexpression kann der Grad der septischen Hypoxie in der Niere untersucht werden und welche potentiellen Auswirkungen die PHD-Aktivitätsinhibierung nach Sepsis hat. Zur Untersuchung der HIF-1α- und HIF-2α-Expressierung im Nierengewebe wurde zunächst nur der Kortextbereich analysiert.

Die Inhibierung der PHD-Enzyme verursachte in den scheineroperierten Mäusen eine leichte Akkumulation von HIF-1α und HIF-2α, allerdings nicht in den NaCl-behandelten LPS-/PCI-Kontrollen (**Abb. 9A bis 9D**). Der Effekt einer reduzierten HIF-1α und HIF-2α-Degradation durch die PHD-Inhibitor-Behandlung wurde nur im CLP-Modell deutlich. Allerdings wiesen die LPS-/PCI-WT-Kontrollen bereits eine erhöhte HIF-1α-Expression im Kortext der Niere auf. Nach Sepsis- bzw. Endotoxämieinduktion wurde eine renale Akkumulation von HIF-1α und HIF-2α in allen Behandlungsgruppen, mit Ausnahme von HIF-1α in den LPS-injizierten WT-Mäusen, beobachtet (**Abb. 9A bis 9D**).



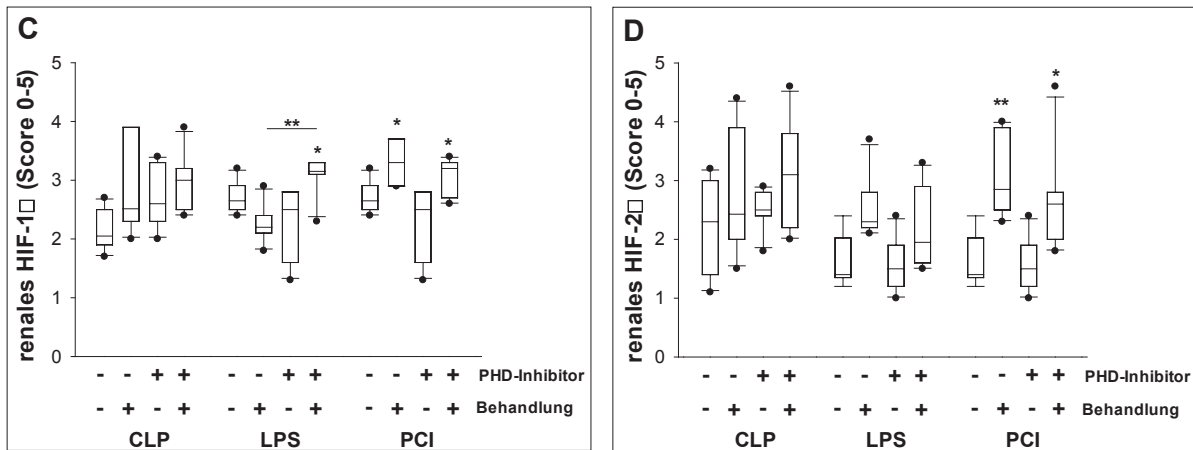


Abb. 9: Renale Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α . Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von (A) HIF-1 α und (B) HIF-2 α im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; I—| entsprechen 100 μ m). Relative Expression von (C) HIF-1 α und (D) HIF-2 α analysiert durch ein Score-System (0-5). n=6.

4.1.3 Analyse der renalen Genexpression von *Morg1* und *Phd3* durch RT-PCR

Prolyl-Hydroxylasen spielen eine wichtige Rolle bei der HIF- α -Degradation. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MORG1 als Scaffold-Protein im PHD3/HIF- α -Komplex involviert ist [Hopfer et al. 2006]. Es wurde gezeigt, dass bei Sepsis vor allem ein knock-out der *Phd3*-Isoform bei Mäusen zur reduzierten Überlebensrate führt [Kiss et al. 2012]. Deshalb wurde von den drei *Phd*'s zunächst nur die Expression von *Phd3* untersucht.

Die Analyse der Genexpression von *Morg1* zeigte tendenziell eine Herabregulation der Genexpression im Nierengewebe 24 h nach Sepsis bzw. Endotoxämie im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen, mit Ausnahme der Expression bei den WT-Mäusen nach LPS (**Abb. 10A**). Die Blockierung der PHD's induzierte eine signifikante Reduktion der basalen *Phd3*-Expression in den sham-LPS/PCI-Mäusen (**p<0,01) (**Abb. 10B**). Die *Phd3*-Expression war nach CLP nicht beeinflusst, unabhängig von der Blockierung der PHD-Aktivität (**Abb. 10B**). Die LPS-Injektion führte bei den WT-Mäusen zu einem signifikant reduzierten *Phd3*-Spiegel, welcher auf dem Niveau der endotoxämischen Mäuse mit gehemmten PHD's lag (**Abb. 10B**). Im PCI-Sepsismodell wiesen die septischen WT-Mäuse ebenfalls eine verringerte *Phd3*-Genexpression in der Niere auf. Die *Phd3*-Expression war in den septischen Inhibitor-behandelten Mäuse zwar signifikant hochreguliert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (*p<0,05), allerdings niedriger als bei den WT-Kontrollen (**Abb. 10B**).

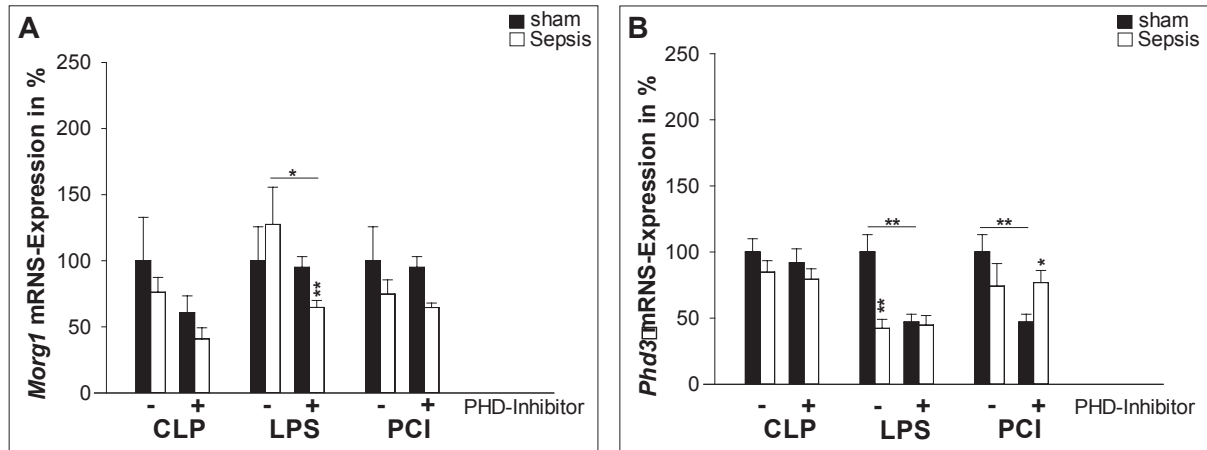
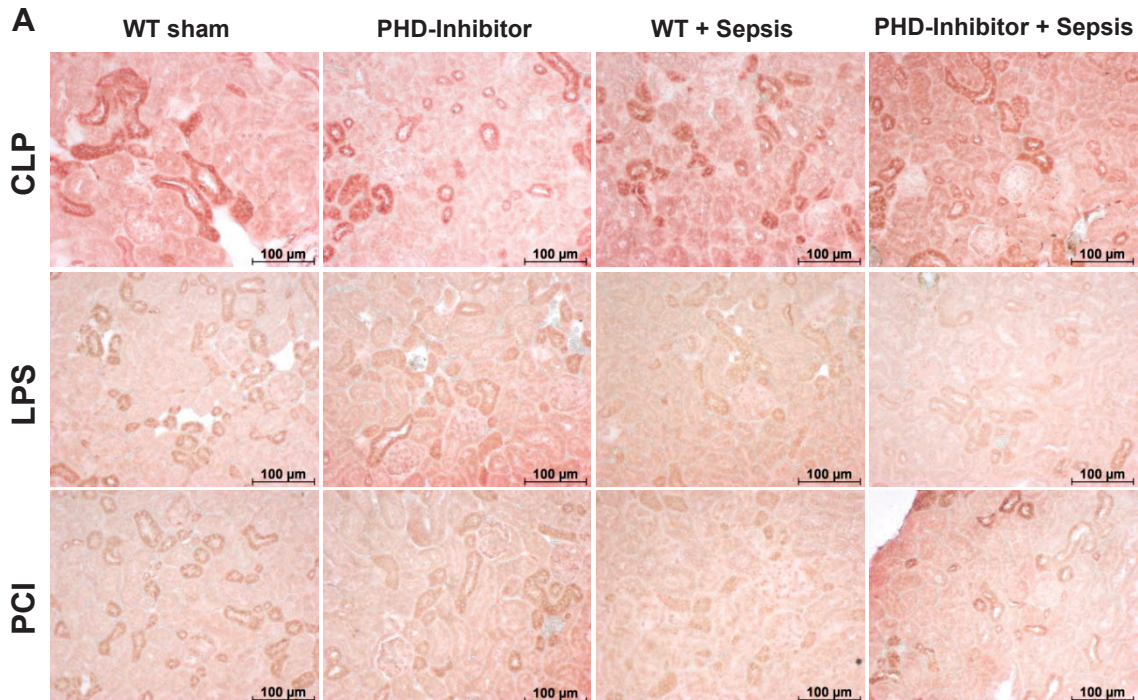


Abb. 10: *Morg1*- und *Phd3*-Genexpression. Die Genexpressionsspiegel von (A) *Morg1* und (B) *Phd3* wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen verglichen. n=9-12.

4.1.4 Proteinexpression von MORG1 und PHD3 in der Niere

Immunhistochemische Untersuchungen des Kortexbereiches in der Niere konnten 24 h nach Sepsis bzw. LPS-Endotoxämie keinen Einfluss auf die renale MORG1- (Abb. 11A und 11C) und PHD3- (Abb. 11B und 11D) Proteinexprimierung nachweisen.



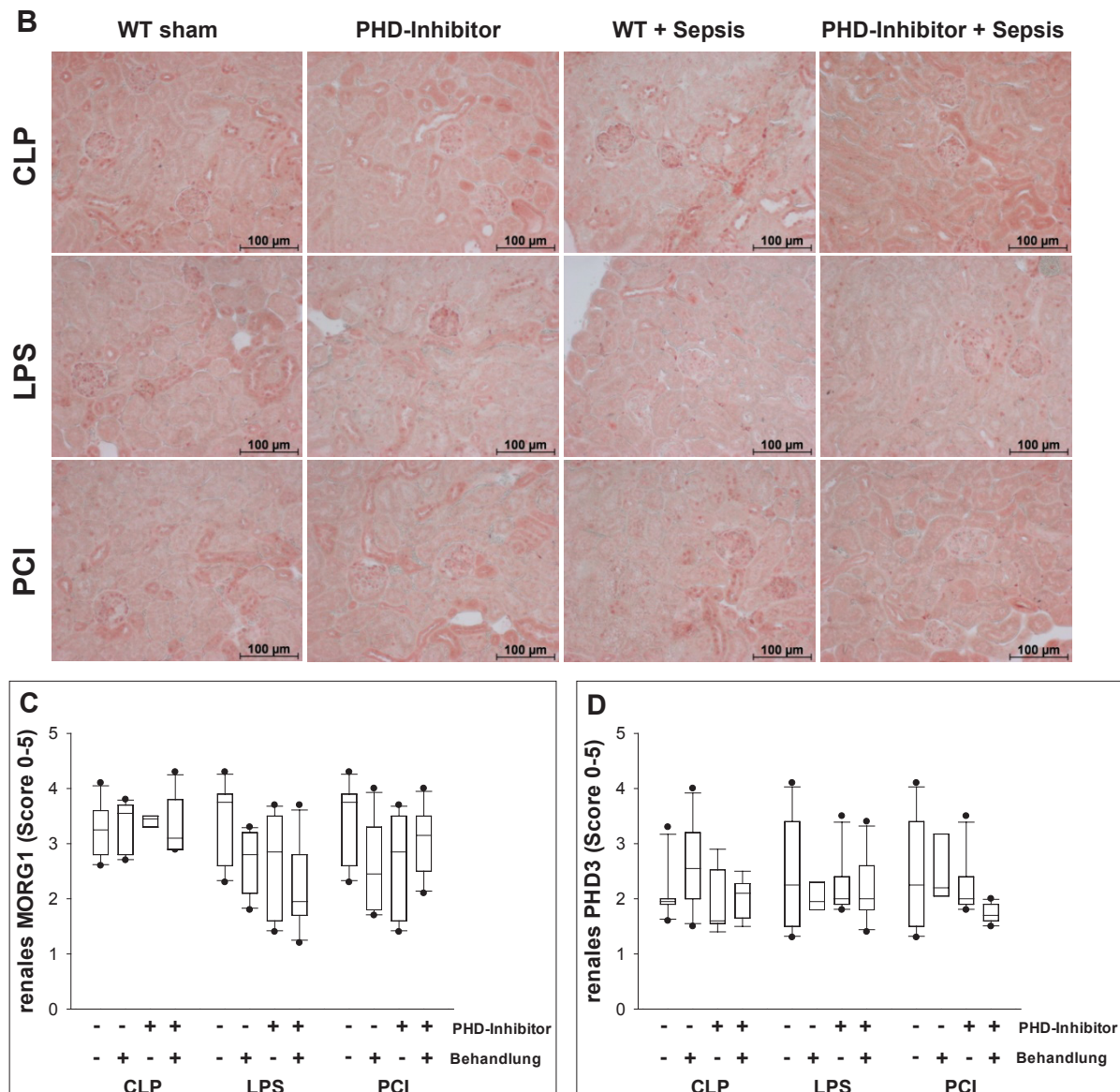


Abb. 11: Renale Proteinexpression von MORG1 und PHD3. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von (A) MORG1 und (B) PHD3 im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; I—| entsprechen 100 µm). Relative Expression von (C) MORG1 und (D) PHD3 analysiert durch ein Score-System (0-5). n=6.

4.1.5 Proteinkonzentrationen von HIF-1 α und MORG1 in der Gesamtniere

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Analysen wurde die Proteinexpression von HIF-1 α und MORG1 mit Hilfe des Western Blot untersucht. Der Western Blot wurde stichprobenhaft zur Überprüfung der immunhistochemischen Daten (siehe 4.1.2 und 4.1.4) durchgeführt. Allerdings handelte es sich um Proteinlysate der Gesamtniere. Die Blots wurden unter exakt den gleichen Bedingung und Expressionszeiten aufgenommen und sind daher für den Stichprobenvergleich verwendbar.

Die Blockierung der PHD's führte in den scheinputerierten und den septischen CLP-Mäusen zu einem höheren HIF-1 α -und MORG1-Niveau in der Niere (**Abb. 12 CLP**). Eine durch CLP

ausgelöste signifikante HIF-1 α -Akkumulation konnte in beiden Mausmodellen (mit jeweils n=3) nicht gezeigt werden. Die Expression von MORG1 war in den Nieren der WT-Mäuse nach CLP leicht reduziert. Die Blockierung der PHD-Aktivität führte nach CLP zu keiner Änderung der MORG1-Expression (**Abb. 12 CLP**). Bei den LPS- und PCI- Kontrollmäusen (sham) handelt es sich um dieselben Mäuse (**Abb. 12 LPS/PCI**). Im Gegensatz zum CLP-Modell konnte keine erhöhte Expression von HIF-1 α und MORG1 durch die Inhibierung der PHD's detektiert werden. Nach LPS und PCI wurde in beiden Mausmodellen eine tendenzielle Reduktion von HIF-1 α und MORG1 beobachtet (**Abb. 12 LPS/PCI**).

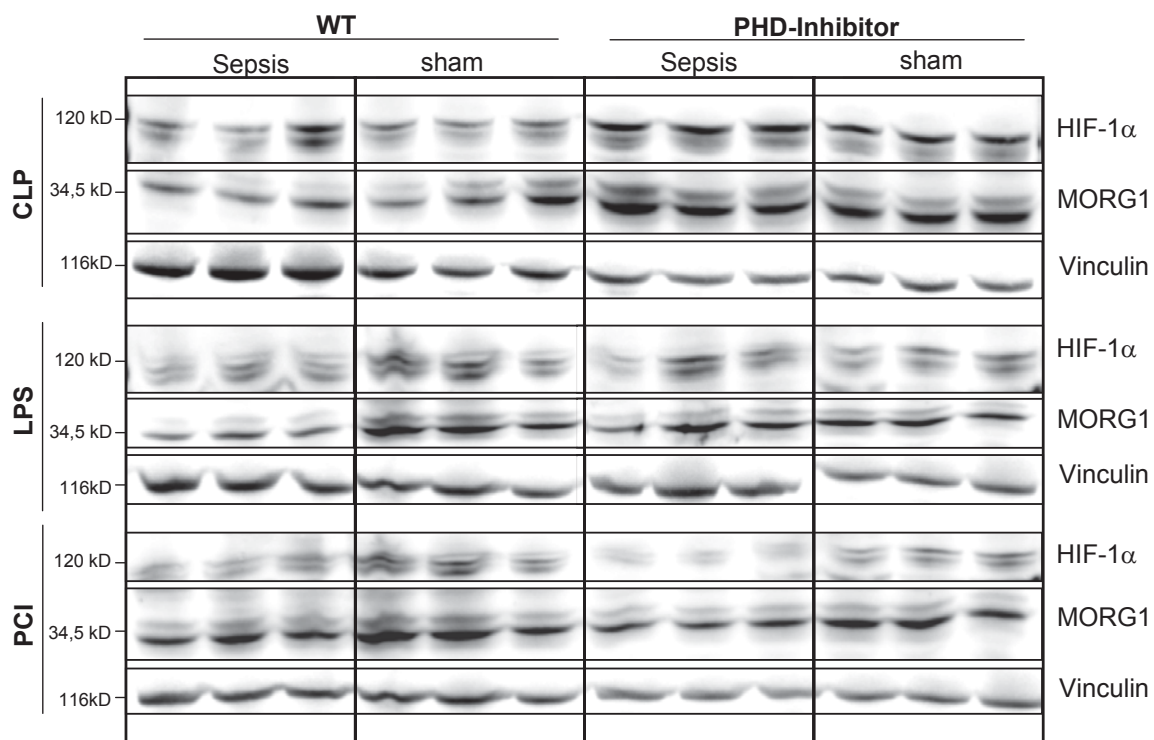


Abb. 12 HIF-1 α - und MORG1-Proteinspiegel im Nierengewebe. Western Blot von Nierenproteinlysaten von WT- bzw. PHD-Inhibitor behandelten Mäusen nach CLP-, LPS- und PCI-Sepsis- oder Endotoxämieinduktion bzw. entsprechender sham-Behandlung (jeweils n=3; LPS- und PCI-sham-Behandlung entsprechen einander).

4.1.6 Analyse der renalen Genexpression von HIF-1 α -Zielgenen durch RT-PCR

HIF- α reguliert die Transkription von vielen verschiedenen Zielgenen, unter anderem *Glut1*, *Epo* und *Vegf*.

Real-Time PCR-Analysen des *Glut1*-Gens zeigten 24 h nach CLP bzw. Endotoxämie eine tendenzielle und nach PCI eine signifikante Erhöhung der Expression (**p<0,01) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in beiden Mausmodellen. Die Hemmung der PHD-Aktivität führte nach der Endotoxinbehandlung zu einer signifikant reduzierten *Glut1*-mRNS-Expression (**p<0,01) (**Abb. 13A**). Hingegen waren die Spiegel von *Epo* und *Vegf* 24 h nach

Sepsisinduktion oder Endotoxämie in Tendenz bzw. signifikant niedriger, mit Ausnahme von *Epo* bei den WT-Mäusen nach CLP (**Abb. 13B und 13C**). Diese Mäuse zeigten eine höhere *Epo*-Expression in der Niere 24 h nach CLP im Vergleich zu den septischen PHD-Inhibitor behandelten Mäusen (* $p < 0,05$) (**Abb. 13B**).

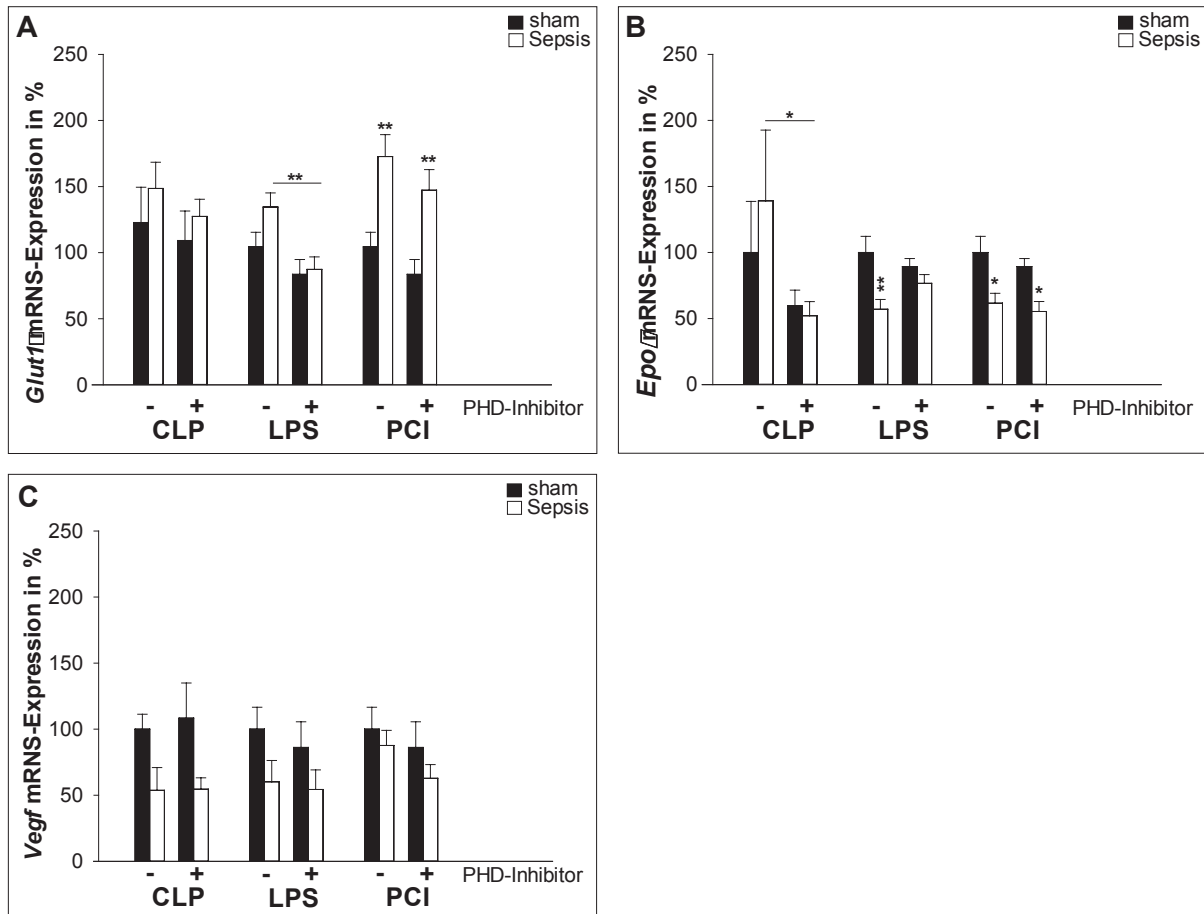


Abb. 13: *Glut1*-, *Epo*- und *Vegf*-Genexpression. Die Genexpressionsspiegel von (A) *Glut1*, (B) *Epo* und (C) *Vegf* wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen verglichen. n=9-12.

4.1.7 Proteinkonzentrationen der HIF-1 α -Zielgene EPO und VEGF im Blutplasma

Eine durch Sepsis ausgelöste Hypoxie geht mit einer verminderten Degradation des HIF- α -Transkriptionsfaktor einher. Durch den PHD-Inhibitor kann eine Degradation von HIF- α medikamentös unterdrückt werden. Beides kann zur erhöhten Transkription von Genen führen, die unter der Regulation von HIF- α sind. Zu diesen gehören unter anderen EPO und VEGF. Wobei VEGF in dieser Rolle kritischer zu betrachten ist, da es auch durch andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1, STAT-3, Egr-1, AP-2, Sp3 und in der Maus zusätzlich durch NF- κ B aktiviert werden kann.

Eine Blockade der Degradation von HIF- α durch den PHD-Inhibitor 3,4-DHB spiegelte sich in der gesteigerten Expression von EPO (**Abb. 14A ■ sham**) und VEGF (**Abb. 14B ■ sham**) im Blutplasma nach CLP, LPS und PCI wider. 24 h nach CLP wurden leicht erhöhte EPO- und VEGF-Werte in den septischen WT-Mäusen gemessen. Im Gegensatz dazu führte die Hemmung der PHD's nach CLP, LPS und PCI zu niedrigeren EPO- und VEGF-Spiegel im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollmäusen (**Abb. 14A und 14B**). Nach LPS und PCI wurde in beiden Behandlungsgruppen eine erhöhte Konzentration von EPO im Blutplasma ermittelt (**Abb. 14A**). VEGF hingegen war nach LPS und PCI nur in den septischen WT-Mäusen erhöht. Die Inhibierung der PHD's führte zu reduziertem VEGF-Blutplasma nach LPS und PCI (**Abb. 14B**).

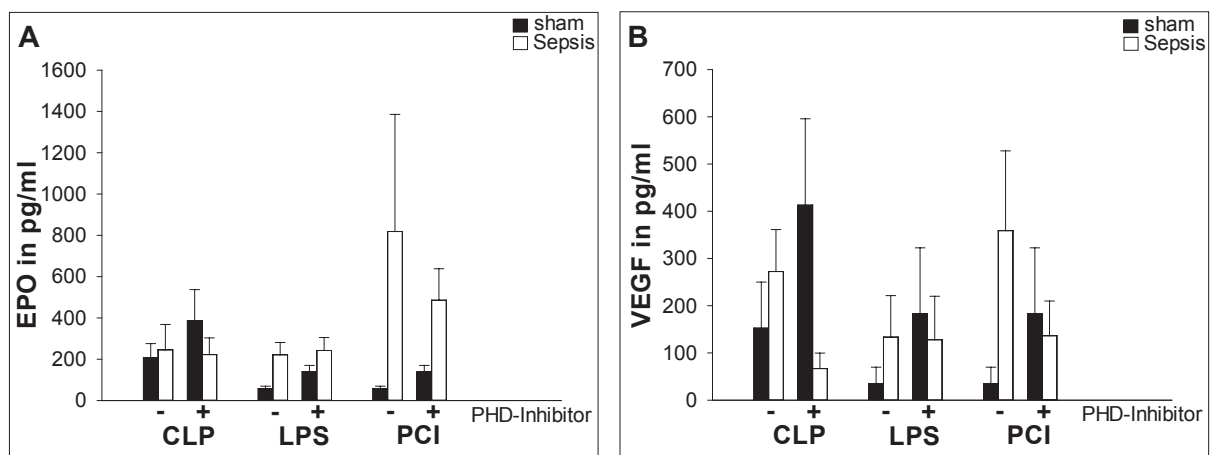


Abb. 14: EPO- und VEGF-Spiegel im Blutplasma. 24 h nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxin-Behandlung wurden (A) EPO und (B) VEGF im Blutplasma durch ELISA bestimmt. n=6-12.

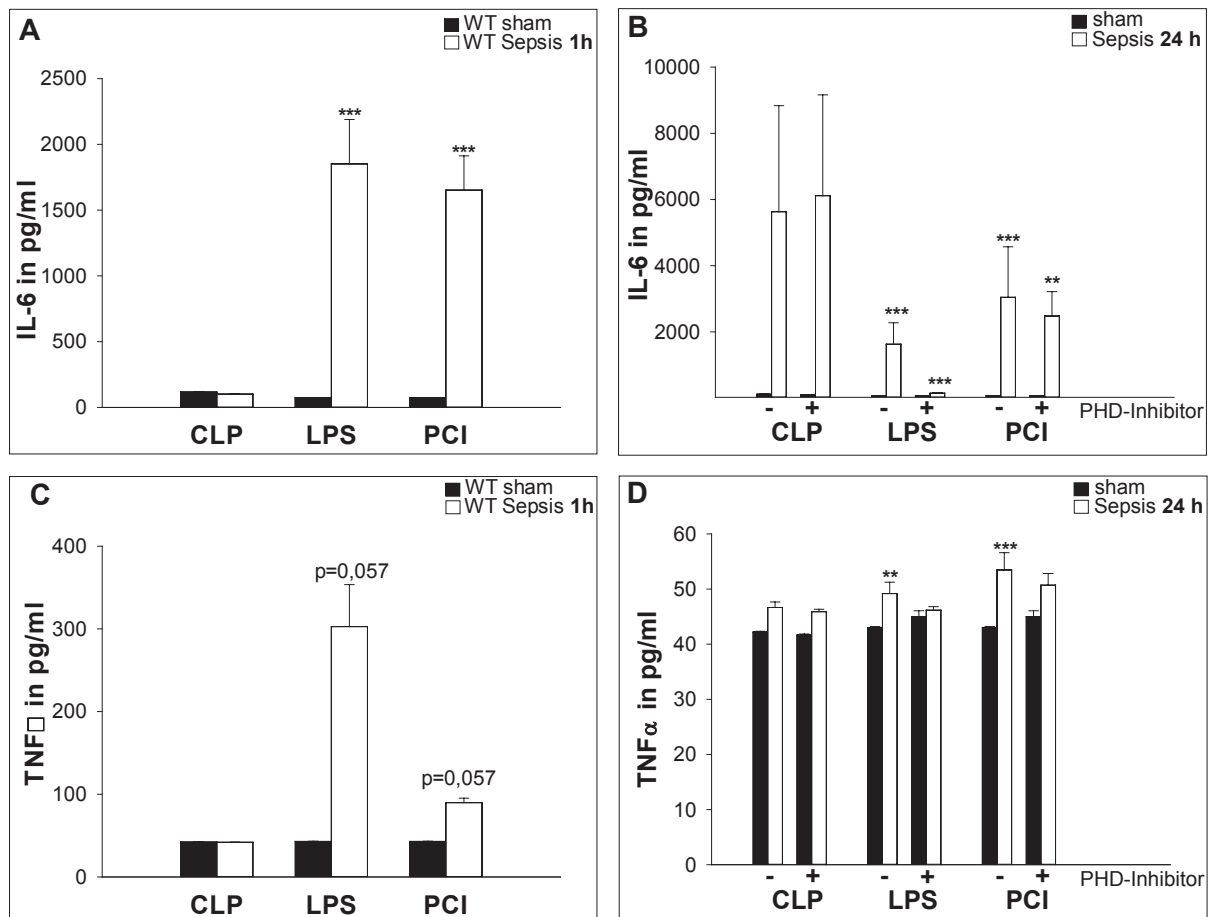
4.1.8 Inflammation und Sepsis

4.1.8.1 Zytokinspiegel im Blutplasma nach Sepsisinduktion

Die Zytokinspiegel im Blutplasma sollten ursprünglich 24 h nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxin-Gabe gemessen werden (**Abb. 15B, 15D, 15F**). Da vor allem die TNF α -Spiegel kaum einen physiologisch relevanten Anstieg 24 h nach Sepsis bzw. LPS aufwiesen (**Abb. 15D**), wurden zusätzliche Proben bei WT-Mäusen 1 h nach Behandlung entnommen (**Abb. 15A, 15C, 15E**). Aus Gründen des experimentellen Fortschrittes war dies für die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse nicht möglich.

Die LPS- und PCI-Behandlung induzierte bereits nach 1 h eine signifikante Zunahme der IL-6-Expression in den WT-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (**p<0,001). Die CLP hatte nach 1 h keinen Effekt auf die IL-6-Expression im Blutplasma der WT-Mäuse (**Abb. 15A**). Im Blutplasma wurden 24 h nach CLP stark und nach LPS und PCI signifikant erhöhte IL-6-Spiegel detektiert. Die Hemmung der PHD-Aktivität hatte in den Sepsismodellen

CLP und PCI keinen Einfluss auf IL-6 im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen. Hingegen konnte im Endotoxinmodell eine deutlich niedrigere Expression von IL-6 durch die Inhibierung der PHD's gemessen werden (**Abb. 15B**). Trotz statistisch signifikanter Erhöhung von $\text{TNF}\alpha$ in den WT-Mäusen 24 h nach LPS (** $p<0,01$) und PCI (** $p<0,001$), entsprach dies nur einem sehr geringen physiologisch relevanten Anstieg von $\text{TNF}\alpha$ im Blutplasma (**Abb. 15D**). Die $\text{TNF}\alpha$ -Blutplasmaspiegel der WT-Mäuse 1 h nach LPS und PCI war deutlich erhöht (n.s.; LPS und PCI jeweils $p=0,057$; $n=3-4$). Für $\text{TNF}\alpha$ wurde 1h nach CLP, wie bei den anderen Zytokinen, keine Änderung festgestellt (**Abb. 15C**). Die Messung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 konnte eine leichte Erhöhung der Expression 1 h und 24 h nach PCI zeigen. Dieser Anstieg entsprach zu den gemessenen Zeitpunkten nicht den für eine Sepsis bekannten physiologisch relevanten Werten [Dahlke et al. 2011], welche ein „Überschießen“ der Entzündungsreaktion verhindern soll.



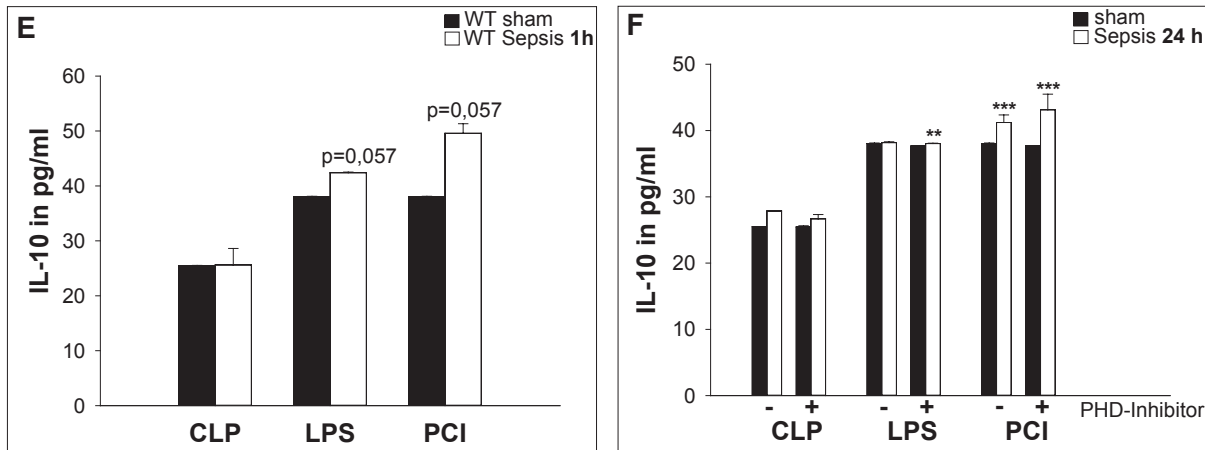


Abb. 15: Pro- und antiinflammatorische Zytokine. Blutplasmazytokinspiegel nach CLP, LPS bzw. PCI. Zytokinspiegel von (A) IL-6, (C) $\text{TNF}\alpha$ und (E) IL-10 gemessen im Blutplasma von n=3-4 WT-Mäusen 1 h nach Behandlung. Zytokinspiegel von (B) IL-6, (D) $\text{TNF}\alpha$ und (F) IL-10 gemessen im Blutplasma von n=9-12 WT- bzw. PHD-Inhibitor behandelten Mäusen 24 h nach Behandlung. Die Messungen fanden mit Hilfe des Capture-Bead-Assays am Durchflusszytometer statt.

4.1.8.2 Zytokin-Genexpression im Blut

Um einen besseren Einblick in den Verlauf der Immunreaktion zu erlangen, wurde die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf α* , *Inf γ* , *Il-1 β* und *Il-2* im Blut 4 h nach Sepsis bzw. Endotoxin-Injektion analysiert.

Im CLP-Sepsismodell (**Abb. 16A**) wurde, verglichen mit LPS (**Abb. 16B**) und PCI (**Abb. 16C**), keine größere Änderung der Genexpression der Zytokine nachgewiesen. Die Scheinoperation selber führte bereits zur Hochregulation der gemessenen Zytokine in den sham-WT-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Die basale Expression von *Tnf α* , *Il-1 β* , *Inf γ* und *Il-2* der scheinoperierten WT-Mäusen zeigte keinen Unterschied zur Expression 4 h nach CLP in den septischen WT-Mäusen (**Abb. 16A**). Die Hemmung der PHD's durch 3,4-DHB führte bei den scheinoperierten Mäusen zu einer deutlich geringeren basalen mRNS-Expression der gemessenen Zytokine, verglichen mit den WT-Kontrollen. Die Zytokinexpression von *Tnf α* und *Il-1 β* der septischen Mäuse mit PHD-Inhibitor-Behandlung war im Verhältnis zu deren Kontrollen hochreguliert, allerdings niedriger als bei den septischen WT-Mäusen. Der immunmodulatorische Regulator der Zytokinexpression sowie Aktivator von Makrophagen *Inf γ* zeigte in den septischen Mäusen mit PHD-Hemmung keinen Anstieg nach CLP. Die Analyse von *Il-2*, als wichtiger Signalgeber für die T-Zellen, wies eine deutlich erhöhte Genexpression bei den septischen PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen auf, welche über dem Expressionsspiegel der septischen WT-Mäuse lag (**Abb. 16A**). Durch die LPS-Injektion konnte nach 4 h in beiden Behandlungsgruppen eine deutlich hochregulierte Expression der vier Zytokine beobachtet werden (**Abb. 16B**). Die Blockierung der PHD-Aktivität führte zur vollständigen Unterdrückung der *Il-2*-Genexpression bei den sham-LPS/PCI-Mäusen sowie bei den LPS-

induzierten Mäusen. Die Hochregulation von *Tnfα* und *Infγ* war nach PHD-Hemmung und LPS geringer, im Vergleich zu den endotoxämischen WT-Mäusen. Die Analyse von *Il-1β* zeigte im Gegensatz dazu eine stärkere Expression aufgrund der PHD-Inhibition (**Abb. 16B**). Die Sepsisinduktion durch PCI führte bei den WT-Mäusen zur vermehrten Expressierung der gemessenen Zytokine (**Abb. 16C**). Die septischen Mäuse mit der reduzierten PHD-Aktivität wiesen ein niedrigeres Genexpressionsniveau von *Tnfα* (* $p < 0,05$) und *Infγ* als die septischen WT-Mäuse auf. Der mRNA-Spiegel von *Il-1β* war in beiden Behandlungsgruppen nach PCI vergleichbar erhöht. Die Blockierung der PHD's führte zu einer stärkeren Hochregulation von *Il-2* als bei den septischen WT-Mäusen (**Abb. 16C**).

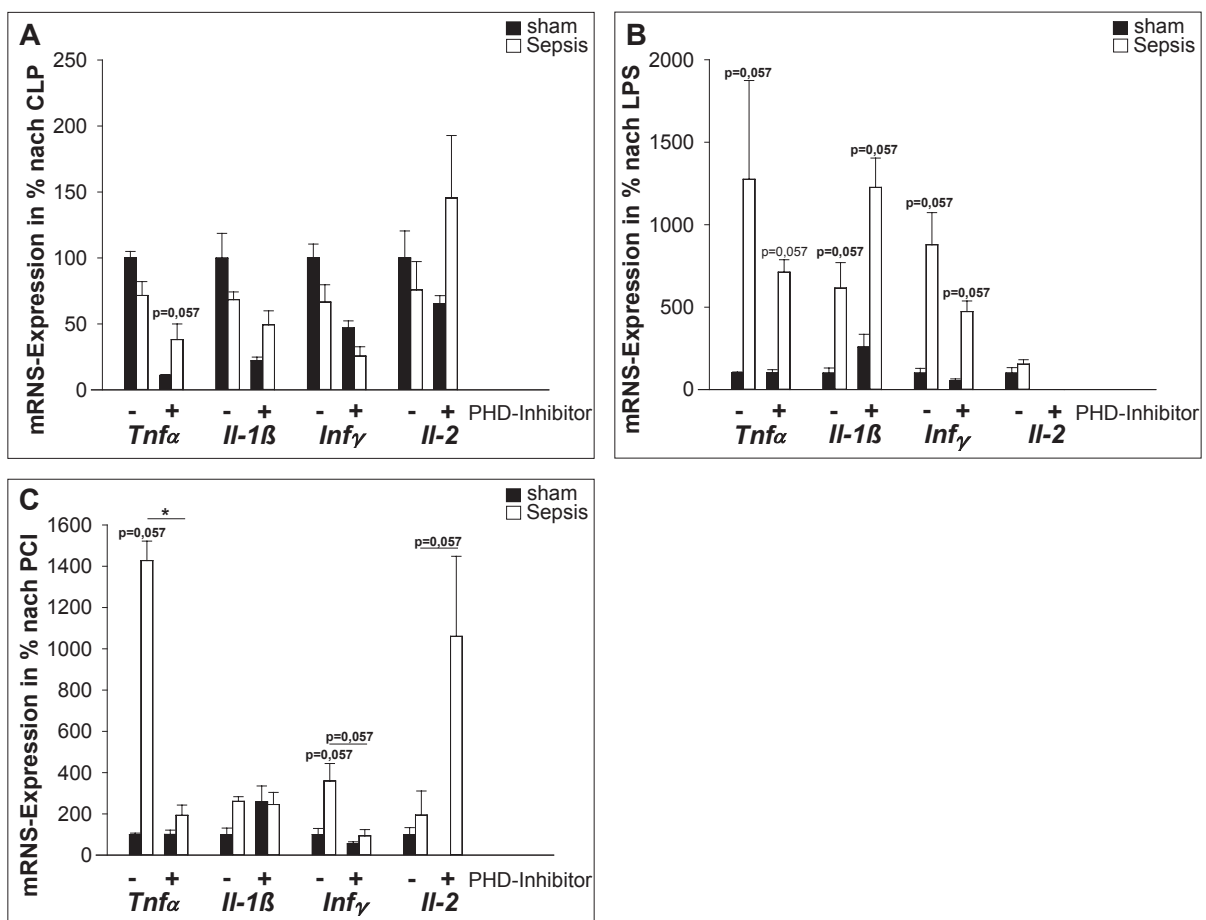


Abb. 16: Zytokin-Genexpression. Im Blut wurde die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *Tnfα*, *Infγ*, *Il-1β* und *Il-2* 4 h nach (A) CLP-, (B) LPS- bzw. (C) PCI-Behandlung analysiert. Die Daten wurden in % relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen verglichen (n=3-4).

4.1.8.3 Analyse der intrarenalen *Tnfα*-Genexpression durch RT-PCR

Zur Charakterisierung der Inflammation im Nierengewebe wurde die Expression des Zytokins *Tnfα* untersucht.

Die Scheinoperation selber führte bei den WT-Mäusen (CLP-sham) bereits zur Hochregulation von *Tnfα* in der Niere (Daten nicht gezeigt). Die scheinoperierten Mäuse mit vorheriger PHD-Blockierung wiesen ein signifikant niedrigeres *Tnfα*-Niveau, im Vergleich zu den WT-Kontrollen auf. Nach Sepsisinduktion durch CLP konnte in beiden Behandlungsgruppen eine Hochregulation der *Tnfα*-mRNS beobachtet werden, allerdings war die *Tnfα*-Expression nach Blockade der PHD's niedriger als bei den septischen WT-Mäusen (**Abb. 17 CLP**). LPS führte im Nierengewebe der endotoxämischen Mäuse ohne ($***p<0,001$) und mit ($**p<0,01$) Hemmung der PHD's zum signifikant erhöhten *Tnfα*-Spiegel, im Vergleich zu den Kontrollen. Die Blockierung der PHD's führte in den endotoxämischen Mäusen zur signifikant niedrigeren Hochregulierung von *Tnfα* ($***P<0,001$) als bei den WT-Mäusen (**Abb. 17 LPS**). Die *Tnfα*-Expression war nach PCI-Sepsis in beiden Behandlungsgruppen signifikant erhöht (**Abb. 17 PCI**).

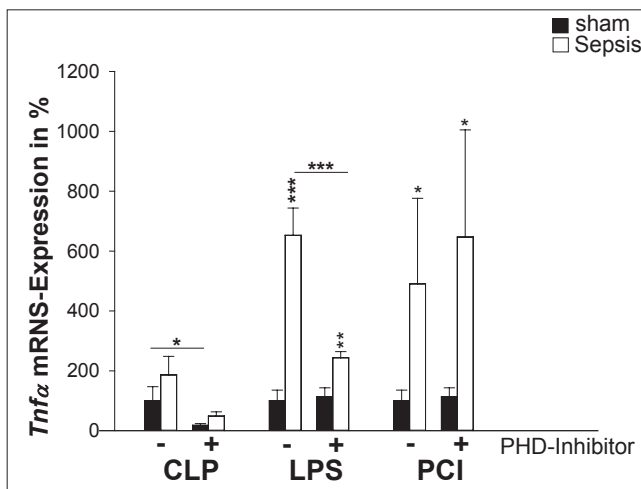


Abb. 17: *Tnfα*-Genexpression. Im Nierengewebe wurde 24 h nach Sepsis die Genexpression des Zytokins *Tnfα* bestimmt. Die Daten wurden in % relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen verglichen. n=9-12.

4.1.8.4 TNFα-Proteinexpression im Nierengewebe

Im Nierengewebe konnte unabhängig von der Vorbehandlung der Versuchstiere und der Art des Eingriffes (CLP, LPS oder PCI) ein renaler Anstieg von TNFα, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen, beobachtet werden (**Abb. 18A und 18B**). Die Hemmung der PHD-Aktivität reduzierte die basale TNFα-Proteinexpression ($*p<0,05$) im LPS- und PCI-Modell (**Abb. 18A und 18B** LPS und PCI). Die CLP verursachte eine signifikante Erhöhung ($*p<0,05$) von TNFα in den WT-Nieren (**Abb. 18A und 18B** CLP). Die Blockierung der PHD's führte nach CLP ($**p<0,01$) und PCI ($p^*<0,05$) zu einer reduzierten sepsisabhängigen TNFα-Expression (**Abb. 18A und 18B** CLP und PCI).

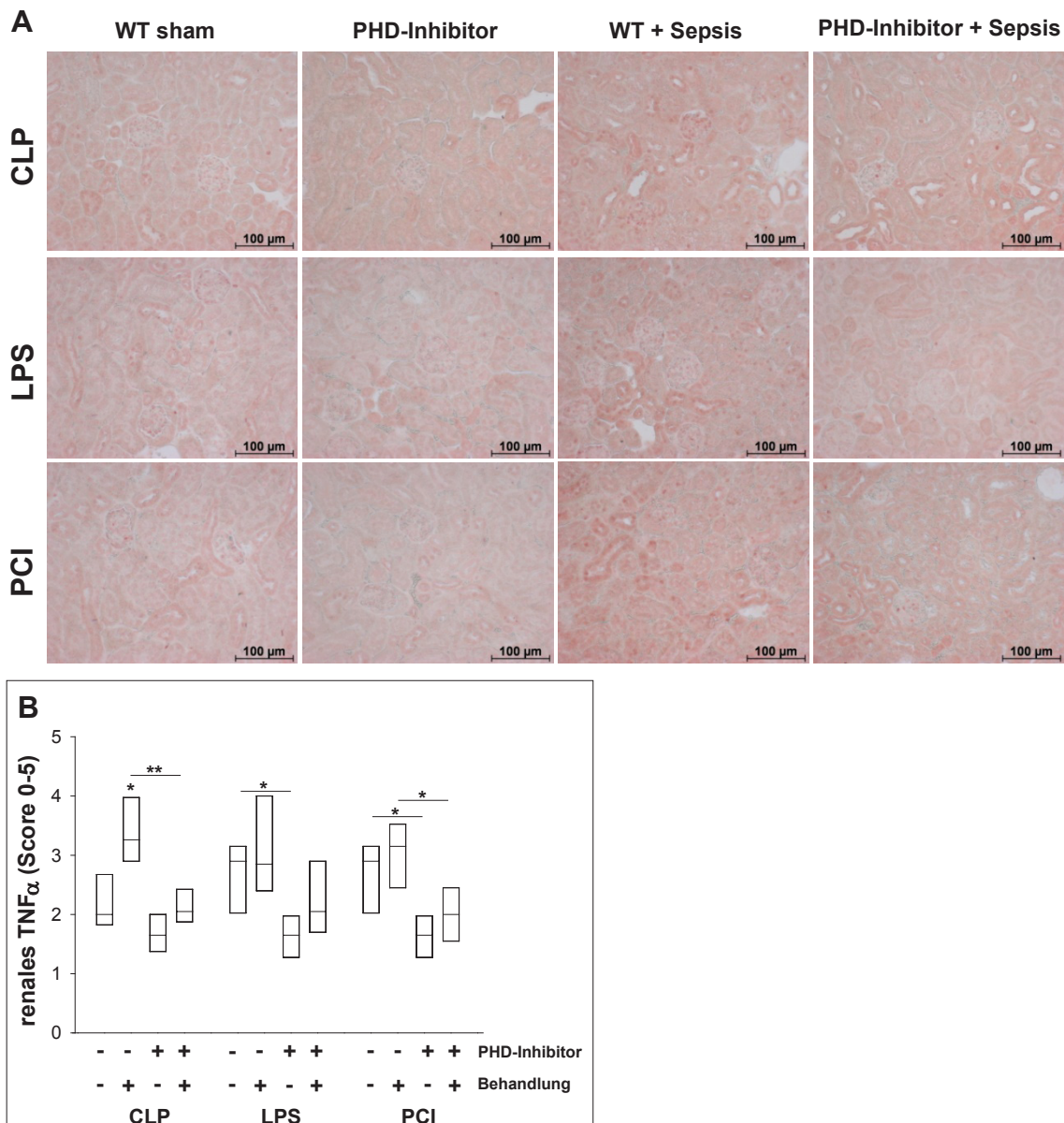


Abb. 18: Renale Proteinexpression von $\text{TNF}\alpha$. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von $\text{TNF}\alpha$ im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 100 μm). (B) Relative Expression von $\text{TNF}\alpha$ analysiert durch ein Score-System (0-5). $n=6$.

4.1.8.5 Sepsisbedingte T-Zellinfiltration in die Niere

Eine interstitielle T-Zellinfiltration im Gewebe wurde durch die CD3-Färbung untersucht.

In den Nieren der WT-Mäuse war eine signifikante T-Zellinfiltration 24 h nach CLP (* $p<0,05$), LPS (** $p<0,01$) und PCI (** $p<0,01$) zu beobachten. Die Blockierung der PHD-Aktivität verminderte die T-Zellinfiltration im Nierengewebe nach CLP (n.s.), LPS (** $p<0,001$) und PCI (n.s.) (Abb. 19A und 19B).

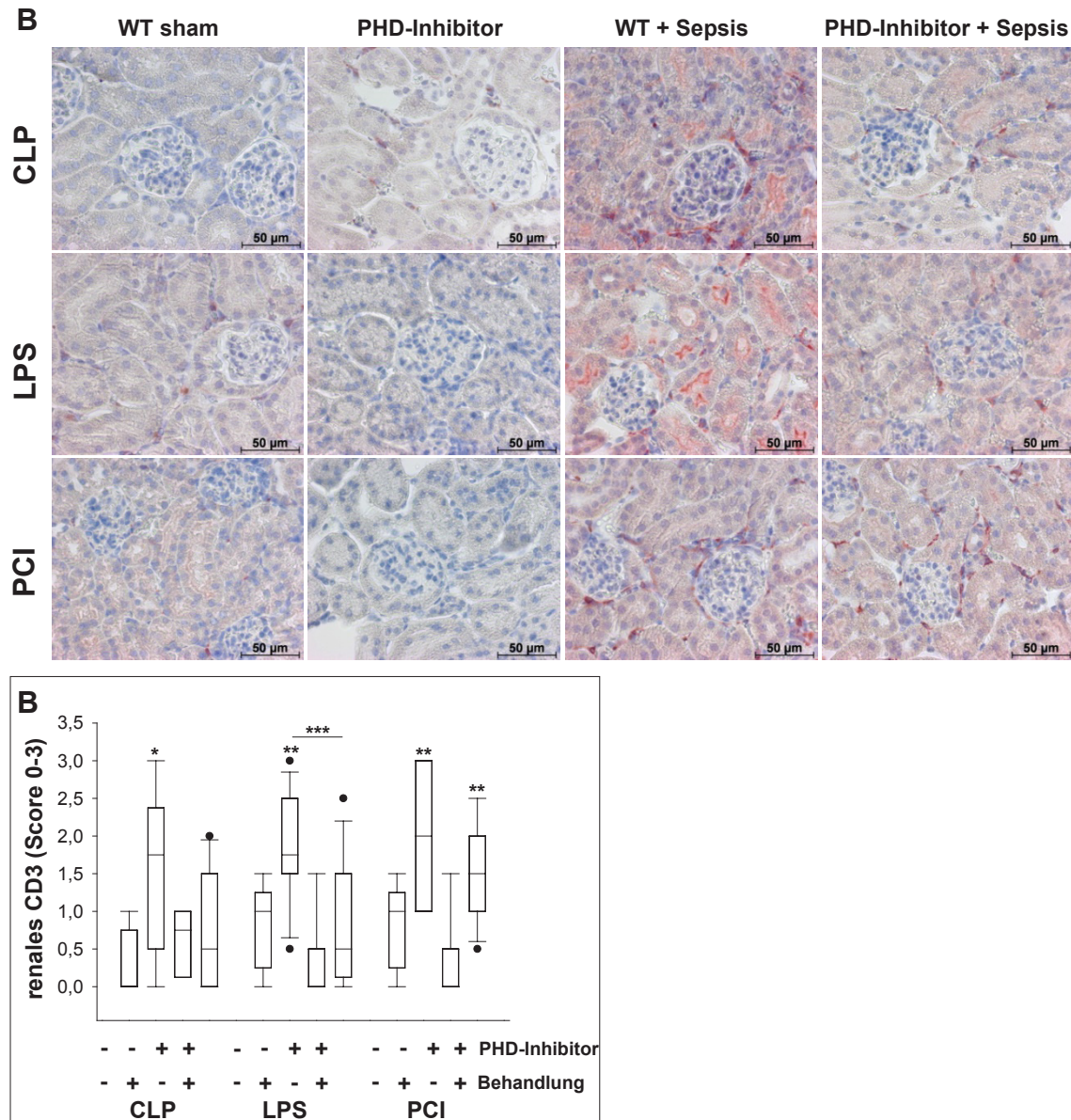


Abb. 19: CD3-Färbung im Nierengewebe. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von CD3 im paraffinierten Nierengewebe, die zur Detektion der T-Zellinfiltration diente (400-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 50 µm). (B) Relative Expression von CD3, analysiert durch ein Score-System (0-3). n=9-12.

4.1.9 Histopathologische Untersuchung des Nierengewebes

Eine histopathologische Beurteilung der Nieren mit Hilfe der PAS-Reaktion ermöglicht die Quantifizierung einer AKI. Bei Nierenschädigung ist die primär am häufigsten geschädigte Struktur der proximale Tubulus. Dieses wird auch als Tubulusnekrose bezeichnet und ist meist Ursache einer „prärenalen“ Schädigung. Diese ist oft die sekundäre Folge eines ischämischen oder toxischen Nierenschadens und kann z.B. durch Sepsis ausgelöst werden [Ambühl März 2001].

Durch die PAS-Reaktion konnten die Änderungen der Bürstensaummembran im kortikalen Tubuli sichtbar gemacht werden. Ein Verlust bzw. das Abflachen dieser Pink gefärbten Bürs-

tensaummembran und eine milde Dilatation der proximalen Tubuli in den CLP- und PCI-sepsisinduzierten WT und PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen konnte beobachtet werden (**Abb. 20** CLP und PCI). Eine bei sepsistypische Vakuolisierung der proximalen Tubuli [Doi et al. 2009a] wurde vor allem bei den septischen WT-Mäusen entdeckt. Die Observation bei den PHD-Inhibitor-vorbehandelten Mäusen offenbarte eine geringere Schädigung des Nierengewebes, verglichen mit den septischen WT-Mäusen. Die Analyse der mit dem Endotoxin LPS behandelten Mäuse, zeigte in keiner der Gruppen eine Veränderung im Nierengewebe (**Abb. 20** LPS).

Die mechanische glomeruläre, arterielle, arteriole oder tubuläre Abflussstörung, z.B. bei Ablagerung von Amyloiden, kann neben der strukturellen Tubulusnekrose zur AKI führen.

Die Nierenschnitte der septischen Versuchstiere wurden mit Hilfe der Kongorot-Färbung auf Ablagerungen untersucht. Es konnten keine Amyloide detektiert werden, daher werden die Abbildungen hier nicht gezeigt.

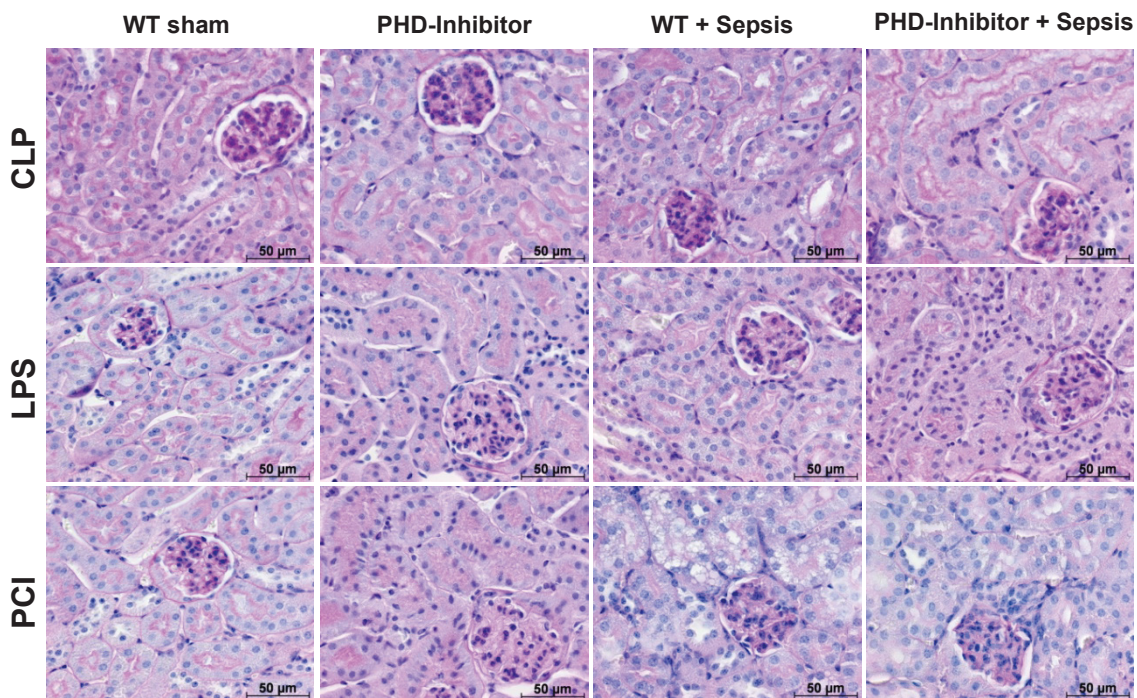


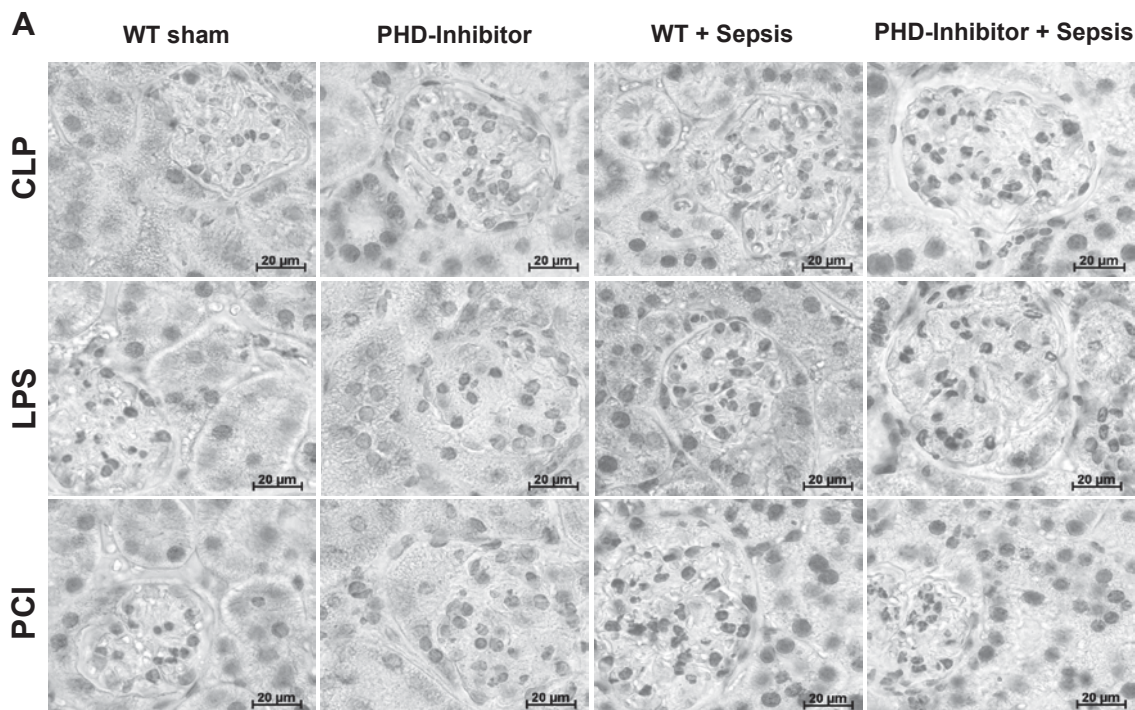
Abb. 20: PAS-Reaktion. Histopathologische Untersuchung des in Paraffin eingebetteten Nierengewebes 24 h nach Sepsis bzw. entsprechender sham-Behandlung (400-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 50 µm). n=9-12.

4.1.10 Sepsisinduzierte Apoptose im Nierengewebe

4.1.10.1 Detektion von renaler Apoptose mit Hilfe des TUNEL-Assays

Das TUNEL-Detektionsverfahren basiert auf dem Erkennen von DNS-Strangbrüchen zum Nachweis von Apoptose. Da es im Nierengewebe mit dieser Methode falsch positive Färbungen gibt, wurden die Zellkerne densitometrisch ausgewertet.

Nach der Auswertung der Kernfärbungsintensität im Glomerulus- und Tubulusbereich der septischen Mäuse konnte in beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zu den nicht-septischen Mäusen eine renale Apoptose nach CLP und PCI dokumentiert werden. Die Injektion der Mäuse mit LPS führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Kernfärbung in beiden Behandlungsgruppen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit und ohne Blockierung der PHD-Aktivität nach CLP, LPS und PCI festgestellt (**Abb. 21A und 21B**).



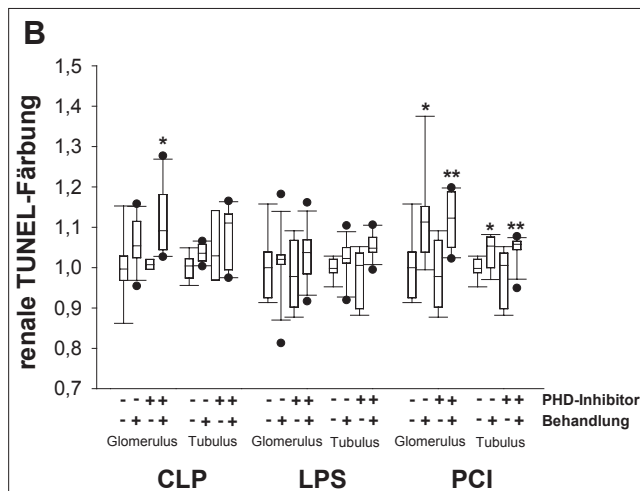


Abb. 21: TUNEL-Assay. (A) Detektion und (B) Quantifizierung der Apoptose im Nierengewebe nach Sepsis-, Endotoxämie- bzw. entsprechender sham-Behandlung (Ausschnitt bei 400-facher Vergrößerung; I—I entsprechen 20 µm). Auswertung der optischen Intensitäten mit Hilfe von ImageJ, normalisiert und relativ zu den jeweiligen WT-sham-Kontrollen. n=9-12.

4.1.10.2 Detektion des Apoptosemarkers „aktive Caspase 3“

Um die apoptotische Analyse mit einer zusätzlichen Methode zu verifizieren, wurden die Nierenschnitte auf aktive Caspase 3 durch Immunhistochemie untersucht. Caspase 3 gehört zu den Effektor-Caspasen die zelleigene Proteine spaltet, aber auch Nukleasen aktiviert. Diese spalten während der Apoptose die nukleäre DNS.

Zur Untersuchung wurden die aktiven Caspase 3-Spots im Nierenquerschnitt ausgezählt. Nach CLP, LPS und PCI wurde in beiden Mausmodellen renale Apoptose signifikant induziert. Die Blockierung der PHD's reduzierte diesen Effekt der renalen Apoptose nach Sepsis bzw. Endotoxämie, im Vergleich zu den entsprechenden WT-Kontrollen (**Abb. 22**).

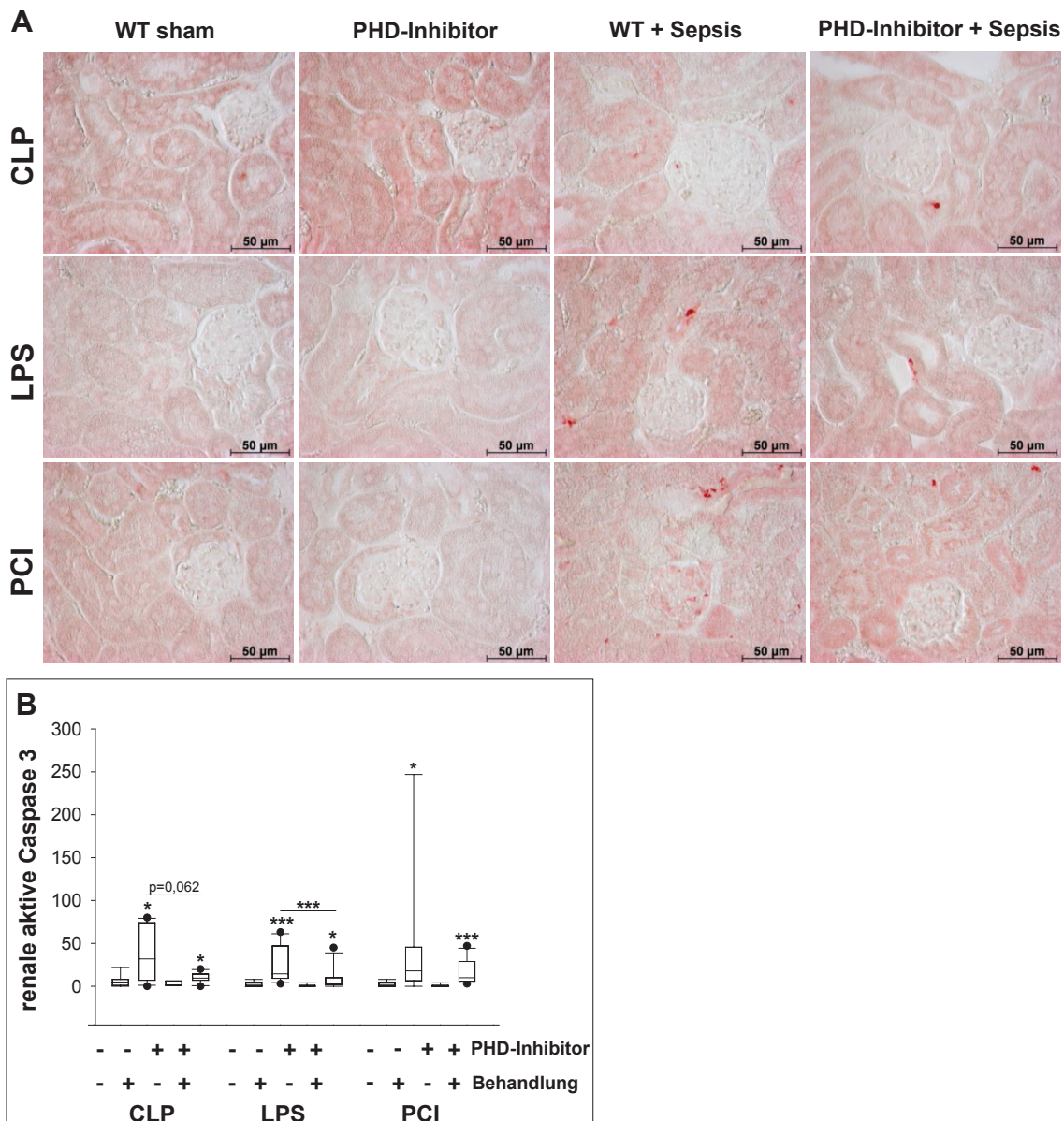


Abb. 22: Aktive Caspase 3. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse der aktiven Caspase 3 im Nierenschnitt (400-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 50 μ m). (B) Anzahl der aktiven Caspase 3-Spots im Nierenquerschnitt. n=9-12.

4.1.11 Einfluss von PHD-Inhibitoren auf den klinischen Status nach Sepsis

4.1.11.1 Klinischer Schweregrad (CSS) der septischen Mäuse

Die Charakterisierung des klinischen Schweregrades wurde 4 h und 24 h nach Sepsisinduktion mit Hilfe eines Scores (CSS) bestimmt [Gonnert et al. 2011]. Dieser berücksichtigte spontane Aktivität, Reaktion auf exogene Stimuli und die Körperhaltung der Mäuse.

Nach Sepsisinduktion durch CLP und PCI sowie der Injektion des Endotoxins LPS wiesen alle Behandlungen eine signifikante Verschlechterung der beobachteten klinischen Kriterien auf. Die CLP-Behandlung zeigte keinen Unterschied im klinischen Erscheinungsbild zwi-

schen WT und PHD-Inhibitor behandelten Mäusen. In diesem subjektiv gemessenen Score wiesen die PHD-Inhibitor behandelten Mäuse 24 h nach LPS-Injektion eine Verbesserung (** $p < 0,001$) ihres Erscheinungsbildes auf, während die Mäuse nach PCI-Sepsisinduktion eine Verschlechterung (** $p < 0,01$) zeigten. Die LPS- und PCI-Kontrollen zeigten keine Veränderung im äußeren Erscheinungsbild. Die Scheinoperation im CLP-Sepsismodell hatte eine geringfügige Auswirkung auf das äußere klinische Erscheinungsbild, sowohl bei den WT als auch den PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen (**Abb. 23**).

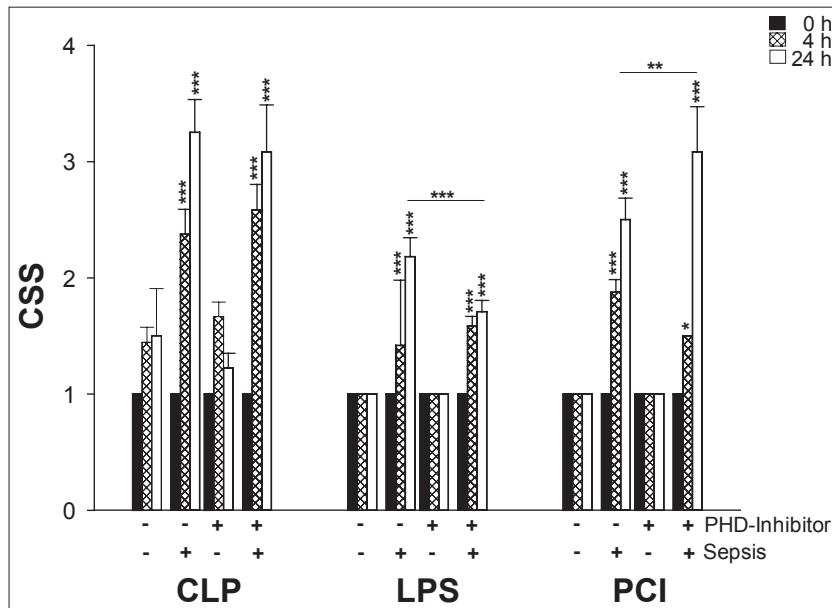


Abb. 23: Klinischer Schweregrad (CSS). Bestimmung des klinischen Schweregrades 4 h und 24 h nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxininjektion. Der Score reicht von 1 = keine Anzeichen einer Erkrankung der Mäuse bis 4 = lethargisch und 5 = Tod der Mäuse [Gonnert et al. 2011]. n=9-12.

4.1.11.2 Sepsisbedingte Gewebeschädigung

Zur Untersuchung der sepsisbedingten Gewebeschädigung wurden verschiedene Marker im Blutplasma 24 h nach Sepsisinduktion bestimmt. Die vier gemessenen Parameter Bilirubin, LDH, AST und ALT werden in der Klinik unter anderem zur Bestimmung des durch Sepsis verursachten Gewebeabbaus genutzt. Vor allem eine Erkrankung der Leber, des Herzens, der Muskulatur und/oder eine hämolytische Anämie kann so nachgewiesen werden. Ein erhöhter LDH in Kombination mit einem erhöhten AST-Wert ist in der Klinik ein Indiz für eine Lebererkrankung (LDH/AST Quotient).

Nach Sepsisinduktion wurde ein Anstieg der gemessenen Parameter in beiden Behandlungsgruppen detektiert (**Abb. 24A bis 24D** CLP und PCI). Die LDH-Erhöhung war nach PCI sowohl für die WT- (** $p < 0,01$) als auch für die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse (** $p < 0,01$) signifikant (**Abb. 24B**). ALT war nach Hemmung der PHD's im CLP- und PCI-Modell tendenziell höher im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen (**Abb. 24D**). Im Endotoxin-Modell

konnte ein leichter Anstieg bei LDH in beiden Tiergruppen, sowie eine Erhöhung von AST bei den PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen beobachtet werden (**Abb. 24B und 24C**). Auf die metabolischen Marker Bilirubin und ALT hatte LPS keine Auswirkung (**Abb. 24A und 24D**).

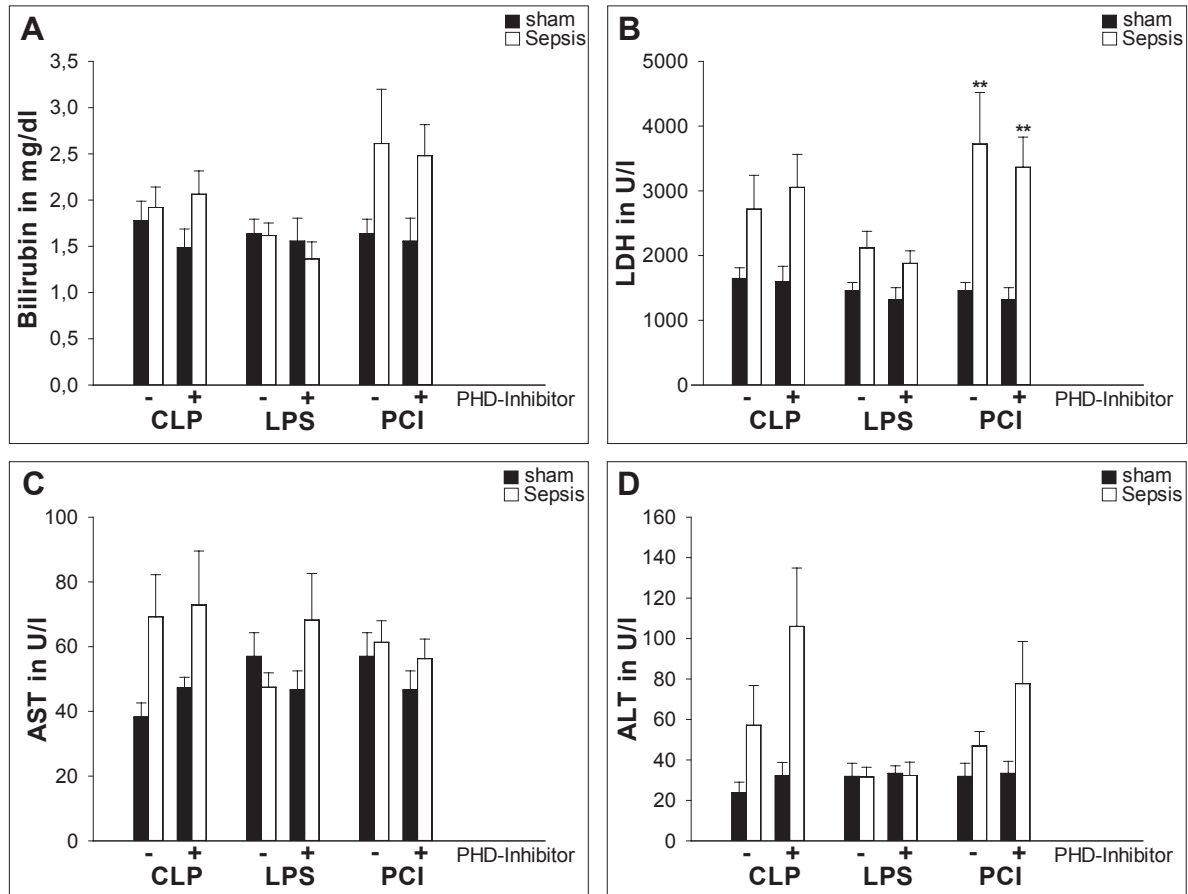


Abb. 24: Effekte der Sepsisinduktion auf Metabolismusparameter im Blutplasma. (A) Bilirubin, (B) Laktatdehydrogenase (LDH), (C) Aspartat-Aminotransferase (AST) und (D) Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutplasma 24 h nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxin-Injektion. n=9-12.

4.1.11.3 Störungen der Nierenretention und Nierenschädigung

Die Leistungsfähigkeit der Niere wurde durch Kreatinin und BUN im Blutplasma bestimmt. NGAL wird unter anderem bei Schäden der Niere im Tubulus freigesetzt. Diese Freisetzung geschieht im Rahmen der inflammatorischen „Akute-Phase-Reaktion“ aus Neutrophilen, Makrophagen oder anderen Immunzellen und kann so als früher Biomarker einen Tubulus-schaden anzeigen [Bruck 2009].

Die Leistungsfähigkeit der Niere war nach CLP in beiden Behandlungsgruppen signifikant beeinträchtigt. Im Blutplasma der WT- und PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse war Kreatinin (WT: ** $p < 0,01$; PHD-Inh.: * $p < 0,05$) 24 h nach CLP signifikant erhöht (**Abb. 25A**). Die LPS-Behandlung und PCI-Sepsis hatte ohne und mit PHD-Blockierung keinen signifikanten Effekt auf den Kreatininspiegel im Blutplasma (**Abb. 25A**). Die Analyse der BUN-Konzentration

zeigte eine leichte Reduktion des basalen BUN-Spiegels nach Hemmung der PHD's in den drei Sepsis- bzw. Endotoxämie-Modellen (**Abb. 25B**). Die Konzentration von BUN war nach der Hemmung der PHD's und anschließender Sepsisinduktion durch CLP (** $p < 0,01$), PCI (** $p < 0,001$) und LPS-Injektion (** $p < 0,01$) signifikant erhöht, während nach alleiniger CLP- und PCI-Sepsis lediglich ein tendenziell (n.s.) erhöhter BUN-Spiegel gemessen wurde. Zudem führte die 3,4-DHB-Behandlung 24 h nach der PCI-Sepsis zu einem signifikant (* $p < 0,05$) und nach LPS-Injektion zu einem leicht (n.s.) reduzierten BUN-Niveau, verglichen mit den WT-Mäusen (**Abb. 25B**). Der NGAL-Spiegel war nach allen Behandlungen, relativ zu den Kontrollen signifikant erhöht (**Abb. 25C**). Die PHD-Inhibition beeinflusste die NGAL-Konzentration im Vergleich zu den WT-Mäusen nach CLP nicht, wohingegen in der Gegenwart des PHD-Inhibitors NGAL im LPS-Modell leicht reduziert und im PCI-Modell leicht erhöht war, verglichen mit den endotoxämischen bzw. septischen WT-Mäusen (**Abb. 25C**).

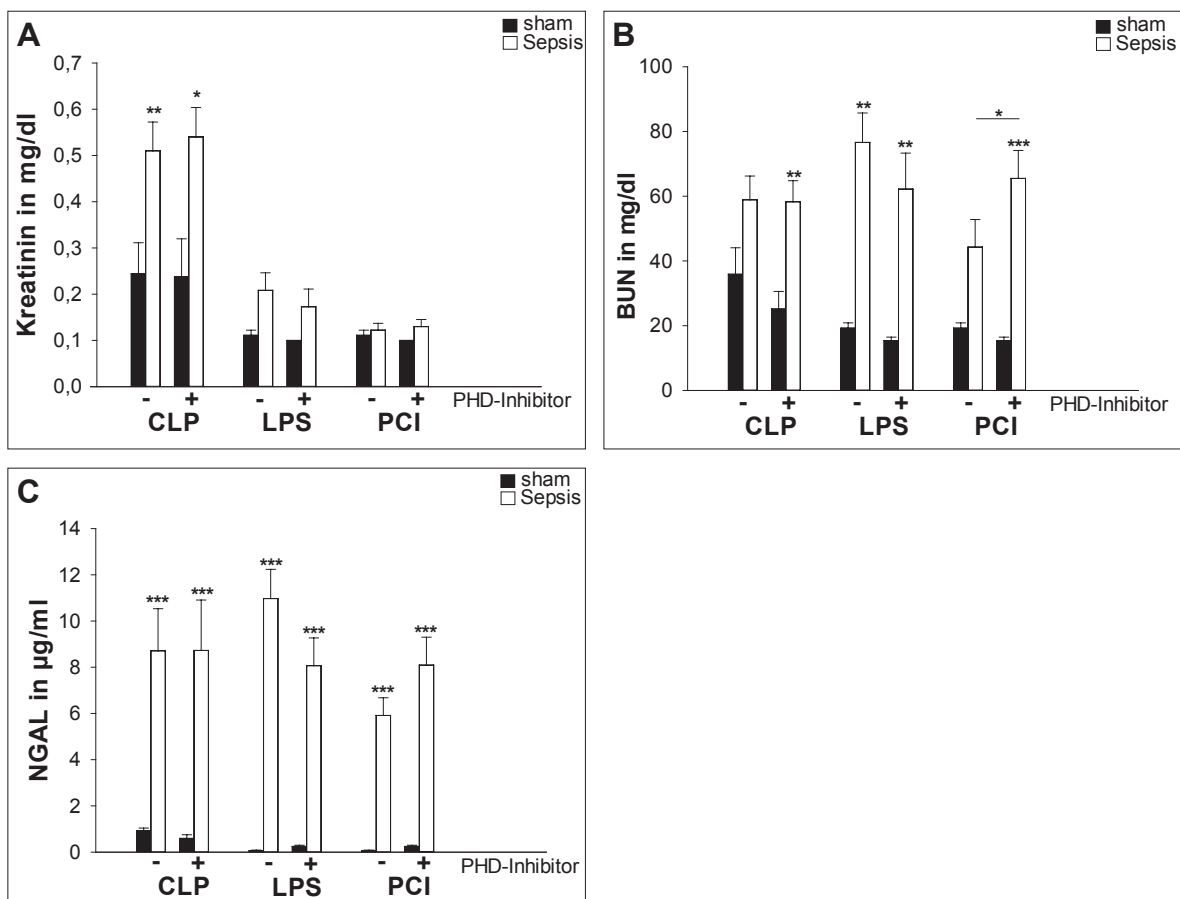


Abb. 25: Nierenretentions- und Nierenschädigungsmarker. (A) Kreatinin, (B) Blutharnstoffstickstoff (BUN) und (C) NGAL wurden im Blutplasma 24 h nach Behandlung gemessen. n=9-12.

4.1.11.4 Untersuchung des Urins zur Bestimmung von Nierenschäden

Zum Nachweis einer Nierenschädigung können Urinwerte von ACR und NGAL-CR sehr hilfreich sein. So kann über die ACR eine glomeruläre Schädigung und mit Hilfe von NGAL-CR

eine Tubulusschädigung detektiert werden. Durch die Messung von NGAL können vor allem die frühen Nierenschädigungen erkannt werden.

Ähnlich der humanen ACR-Bestimmung zeigt ein Wert > 30 mg/g im Urin der Mäuse (**Abb. 26A** —) eine glomeruläre Nierenschädigung an. Durch die Messung der ACR nach CLP konnte in beiden Mausgruppen mit einer ACR von ~ 60 mg/g eine Schädigung festgestellt werden. Die Scheinoperation hatte bereits eine geringfügige Auswirkung auf die glomeruläre Funktion, denn in beiden Mausmodellen mit der Scheinoperation wurde ein mittlerer ACR von ~ 30 mg/g ermittelt. Die Endotoxämie und PCI-Sepsis verursachte bei den WT-Mäusen einen deutlichen Anstieg der mittleren ACR auf > 30 mg/g, während die Hemmung der PHD's nach LPS und PCI nicht zur Erhöhung des ACR über den Grenzwert führte (**Abb. 26A**). Die Bestimmung der NGAL-CR im Urin wies nach der Blockierung der PHD's in den drei Behandlungen eine signifikante tubuläre Schädigung auf. Im Urin der WT-Mäuse wurde eine signifikante Erhöhung von NGAL-CR nach LPS und PCI gemessen. CLP-Sepsis verursachte einen leichten Anstieg der NGAL-CR in den WT-Mäusen, welcher deutlich niedriger im Vergleich zu den PHD-Inhibitor-behandelten-Mäusen war (**Abb. 26B**).

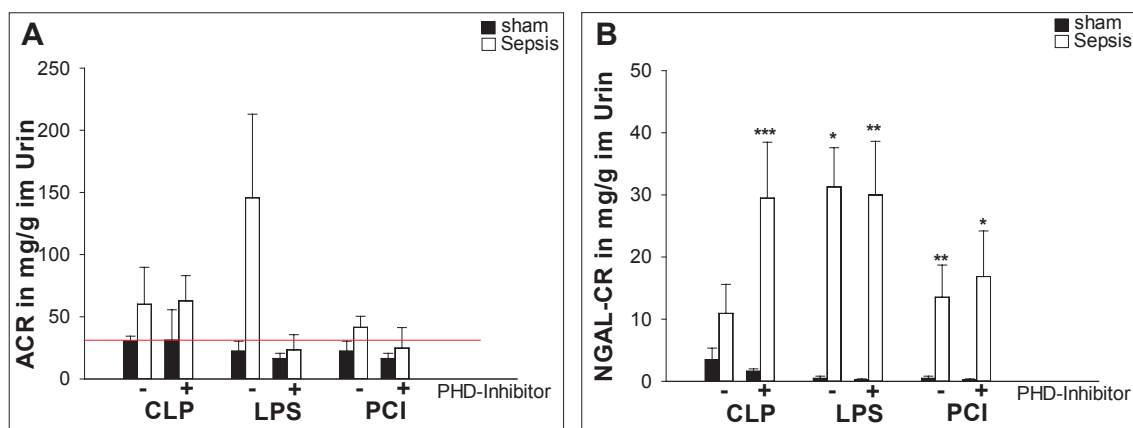


Abb. 26: ACR und NGAL-CR im Urin. Zur Bestimmung der (A) Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) und (B) NGAL- Kreatinin-Ratio (NGAL-CR) wurde der Urin mit Hilfe von ELISA analysiert. $n=4-12$. — ACR > 30 mg/g.

4.1.12 Überlebensraten

Zur Überprüfung der Überlebensrate nach Sepsis von WT-Mäusen ohne und mit PHD-Inhibitor-Behandlung wurden die Mäuse einer CLP-Operation bzw. LPS- oder PCI-Injektion sowie entsprechender sham-Behandlung (WT-Mäuse) unterzogen und 72 h lang beobachtet. 72 h nach Sepsisinduktion via CLP und PCI zeigten die mit PHD-Inhibitor behandelten Mäuse eine deutlich erhöhte Mortalität im Vergleich zu den WT-Mäusen. Die Injektion von 5 mg/kg KG LPS zeigte keine entsprechende Letalität.

Nach der CLP-Sepsisinduktion verstarben 60 % der PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse, während nur 10 % der unbehandelten WT-Mäuse nach 72 h verstarben (**Abb. 27A**). Im Verlauf der Behandlung mit LPS starb eine WT-Maus (**Abb. 27B**). Nach PCI-Injektion waren es 70 % der mit PHD-Inhibitor vorbehandelten Mäuse und 30 % der WT-Mäuse, die nicht überlebten (**Abb. 27C**). Die Statistik nach Kaplan-Maier zeigte eine signifikant erhöhte Letalität zwischen den WT-Kontrollen und den CLP- und PCI-septischen Mäusen mit PHD-Hemmung (CLP: * $p < 0,05$; PCI: ** $p < 0,01$). Es bestand keine Signifikanz nach CLP oder PCI zwischen den septischen WT-Mäusen und den septischen Mäusen, denen zuvor den PHD-Inhibitor injiziert wurde.

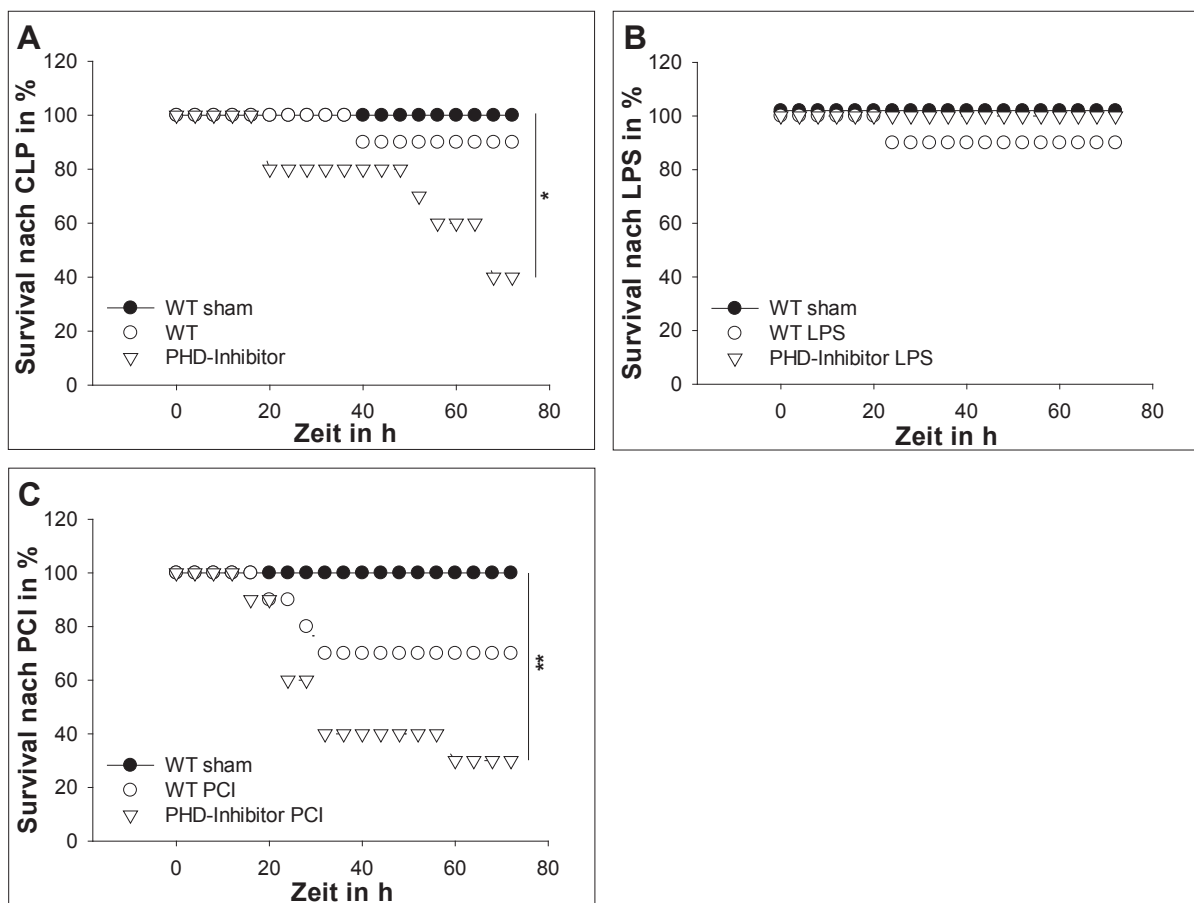


Abb. 27: Überlebenskinetik/Survivalstudie. Untersuchung der Überlebensrate von WT- und PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen nach Sepsisinduktion bzw. Endotoxämie durch (A) CLP, (B) LPS und (C) PCI. Beobachtungen der Mäuse wurden über 72 h dokumentiert. n=10.

4.2 Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System bei sepsisinduzierter Nierenschädigung

Im zweiten Abschnitt des Kapitels Ergebnisse wird der Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System (RAAS) auf die durch Sepsis ausgelösten Nierenschäden vorgestellt. Die Beeinflussung des RAAS wurde durch zwei Methoden realisiert. Zum einen wurden Mäusen zwei Wochen vor Sepsisinduktion eine osmotische Pumpe eingesetzt, die kontinuierlich ANG II freisetzte (zusätzliche exogene Aktivierung de RAAS) und zum anderen wurden die Mäuse einer 5-tägigen Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril vor CLP unterzogen (pharmakologische Hemmung des RAAS). Als Kontrollen wurden Mäuse ohne vorherige Behandlung untersucht. Die Analysen fanden an WT- und heterozygoten *Morg1*^{+/-}-Mäusen, insgesamt 12 Mausgruppen, statt (siehe **Tabelle 7**).

Erläuterung: heterozygote *Morg1*^{+/-}-Mäuse werden im Folgenden nur noch als (heterozygote) HZ-Mäuse bezeichnet.

4.2.1 Klinischer Schweregrad (CSS) der septischen Mäuse

Die klinischen Merkmale – spontane Aktivität, Reaktion auf exogene Stimuli und die Körperhaltung – spiegelten in allen Behandlungsgruppen ein durch Sepsis verschlechtertes klinisches Bild wider [Gonnert et al. 2011]. Eine geringfügige Verschlechterung konnte nach der sham-Operation beobachtet werden. Dies war auf den operativen Eingriff während dieser sham-Behandlung zurückzuführen, von denen sich die Mäuse nach 6 h noch nicht vollständig wieder erholt hatten. Deutlich verschlechtert war das äußere Erscheinungsbild der mit Ramipril behandelten septischen Mäuse, wobei es den septischen HZ-Mäusen 24 h nach CLP im Vergleich etwas besser ging. Zwischen den nicht-vorbehandelten und ANG II-vorbehandelten-Mäusen wurde lediglich bei den septischen WT-ANG II-Mäusen eine leichte Verschlechterung der CSS-Kriterien detektiert (**Abb. 28**). Die septischen WT-Mäuse wiesen ohne Vorbehandlung äußerlich nur geringfügige Auswirkungen auf. Dies war widersprüchlich zu den Beobachtungen im ersten Versuchteil dieser Arbeit (4.1.11.1), in welchem die septischen WT-Mäuse 24 h nach CLP eine deutliche Verschlechterung der klinischen Merkmale aufwiesen. Eine entscheidende Änderung des Versuchablaufes war die Volumengaben von 25 µl/g KG 0,9 %iges NaCl 6 h nach der Scheinoperation bzw. CLP und die Haltung der Mäuse in normalen Käfigen (keine Stoffwechselkäfige – siehe 3.2.3.1). Die Herunterregulation von *Morg1* in den HZ-Mäusen hatte ohne Vorbehandlung bzw. ANG II-Infusion keinen Effekt auf das äußere Erscheinungsbild nach Sepsisinduktion.

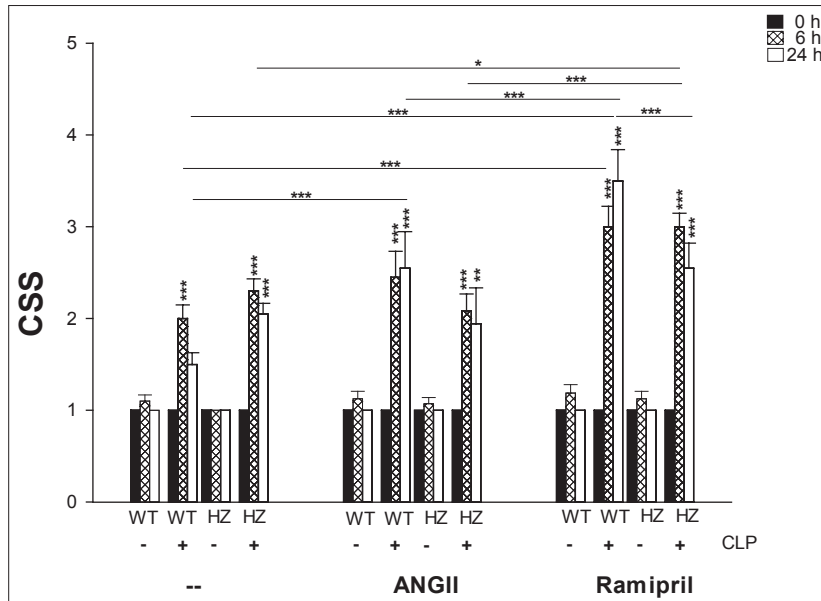


Abb. 28: Klinischer Schweregrad (CSS). Beobachtung klinischer Merkmale nach 6 h und 24 h nach CLP bei WT- und HZ-Mäusen unter Beeinflussung des RAAS. Der Score reicht von 1 (= keine Anzeichen einer Erkrankung der Mäuse) über 4 (= lethargisch) bis 5 (= Tod der Mäuse) [Gonnert et al. 2011]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.2 Analyse des Blutbildes

Eine gesundheitliche Störung kann bereits im Blutbild erkannt werden. Die Analyse des „kleinen“ Blutbildes kann Hinweise auf die medizinischen Ursachen dieser Störungen geben.

Eine verringerte Leukozytenzahl (**Abb. 29A**), wie es hier mit Ausnahme der septischen Ramipril-behandelten WT-Mäuse bei allen septischen Mäusen gemessen wurde, ist typisch für eine Infektion bzw. Vergiftung. Diese Leukopenie (beim Menschen ≤ 4000 Leukozyten/ μl) konnte als Ursache einer schweren Sepsis zugeordnet werden, wobei zu beachten ist, dass auch eine Leukozytose (≥ 12000 Leukozyten/ μl) nach septischem Schock nicht ungewöhnlich ist [Reinhart K 2010]. Die Leukozytenzahl in den sham-operierten unbehandelten HZ-Mäusen war signifikant geringer (** $p < 0,01$) als bei den entsprechenden WT-Mäusen und Ramipril-behandelten HZ-Mäusen. Die septischen Ramipril-behandelten WT-Mäuse zeigten eine leicht erhöhte Leukozytenzahl im Vergleich zu den entsprechend behandelten Kontrollmäusen. Diese lag nicht im Bereich einer Leukozytose. Eine sepsisbedingte Thrombozyten-Depletion auf $\sim 400 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl 24 h nach CLP bei Mäusen konnte bereits in diversen Arbeiten aufgezeigt werden [Meng et al. 2012, Asaduzzaman et al. 2009]. Diese CLP-bedingte Thrombozyten-Depletion (**Abb. 29B**) wurde in allen Mausgruppen gemessen, mit Ausnahme der unbehandelten HZ-Mäuse beobachtet. Die unbehandelten HZ-Kontroll-Mäuse zeigten bereits eine sehr niedrige Plättchenzahl von $406 \times 10^3/\mu\text{l}$ (im Vergleich zu WT-Kontrollen * $p < 0,05$). Diese war durch ANG II- und Ramipril-Behandlung relativiert. Die Thrombozytenzahl war bei den septischen ANG II-behandelten WT-Mäusen signifikant niedriger als bei den septischen HZ-Mäusen (* $p < 0,05$) (**Abb. 29B**). Die Erythrozyten waren 24 h nach CLP in allen Behand-

lungsgruppen nur minimal verändert (**Abb. 29C**). Eine signifikante Erhöhung der Erythrozyten nach CLP konnte bei den Ramipril-behandelten WT-Mäusen (* $p < 0,05$) beobachtet werden. Die ANG II- als auch die Ramipril-behandelten septischen und nicht-septischen WT- und HZ-Mäuse zeigten eine leicht gestiegene Erythrozytenzahl im Vergleich zu den WT- und HZ-Kontrollen (**Abb. 29C**). Der Hämoglobinwert gibt Auskunft über die Bindung von Sauerstoff und ist abhängig von der Zahl der roten Blutkörperchen (**Abb. 29D**). Die WT-Mäuse mit Ramipril wiesen nach Sepsisinduktion den höchsten Hämoglobinwert auf, welcher signifikant erhöht im Vergleich zu den entsprechenden WT-Kontrollen (** $p < 0,01$), den septischen ANG II-WT-Mäusen (* $p < 0,05$) und den unbehandelten septischen WT-Mäusen (***) $p < 0,001$) war. Die Infusion von ANG II erhöhte signifikant das Hämoglobinniveau bei den WT-Mäusen im Vergleich zu den septischen WT-Kontrollen (* $p < 0,05$). In den septischen HZ-Mäusen aller Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied des Hämoglobins relativ zu den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden. Allerdings war der Hämoglobinwert in den septischen HZ-Mäusen mit ANG II leicht reduziert und mit Ramipril leicht erhöht, im Vergleich zu ihren nicht-septischen Kontrollen (**Abb. 29D**). Über den Hämatokrit kann ferner der Volumenanteil der roten Blutkörperchen am Gesamtvolumen des Blutes bestimmt werden. So wurde im Experiment deutlich, dass sowohl die septischen WT-Mäuse mit vorheriger ANG II- (* $p < 0,05$) als auch Ramipril-Behandlung (** $p < 0,01$) im Unterschied zu den septischen unbehandelten WT-Mäusen vermehrt Erythrozyten gebildet hatten (**Abb. 29E**).

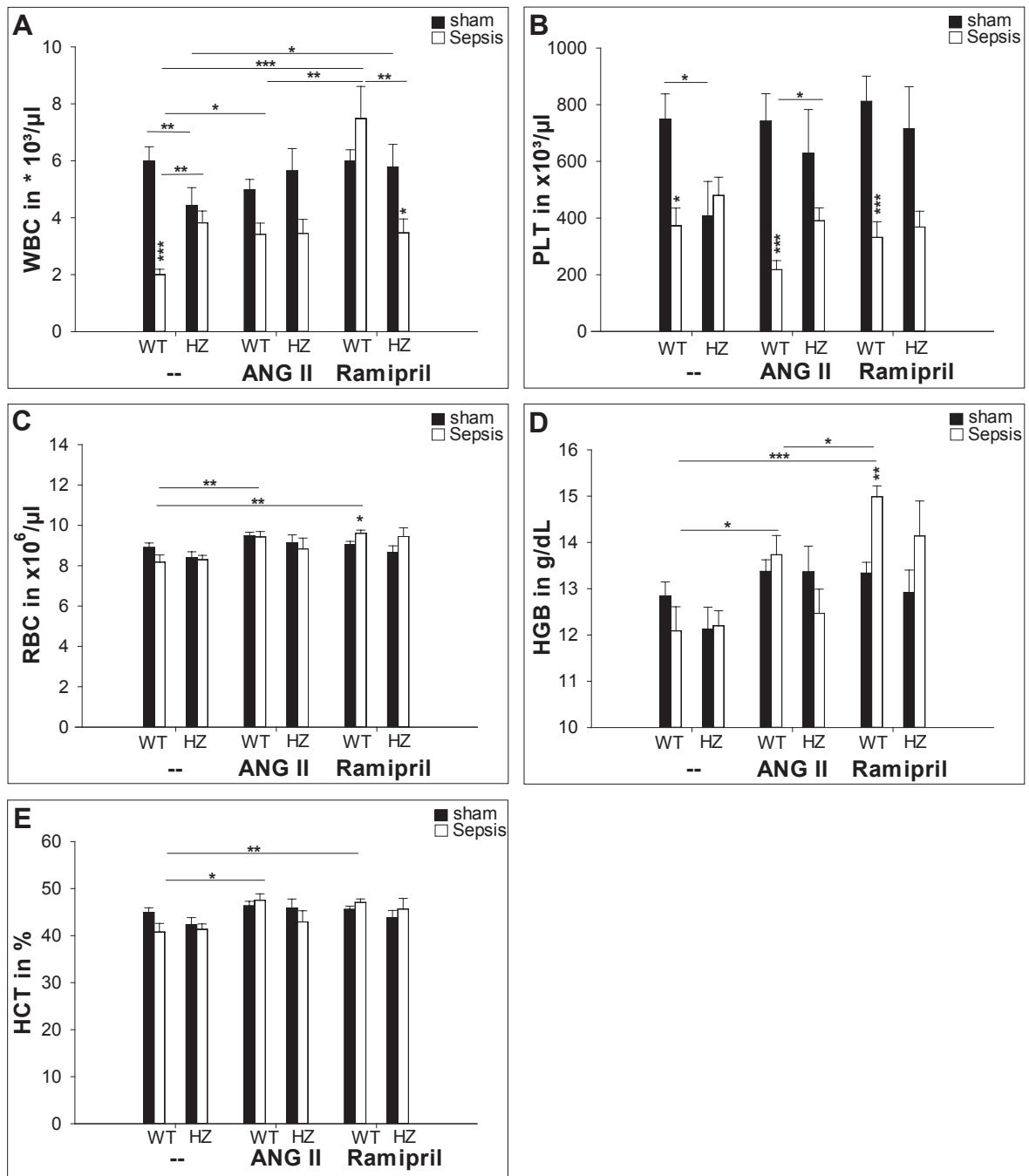


Abb. 29: „Kleines“ Blutbild. Messung der Blutparameter (A) WBC – Weiße Blutkörperchen/Leukozyten, (B) PLT – Blutplättchen/Thrombozyten (C) RBC– Rote Blutkörperchen/Erythrozyten, (D) HGB – Hämoglobin, und (E) HCT – Hämatokrit 24 h nach Scheinoperation (sham) bzw. CLP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.3 Sepsisbedingte Gewebeschädigung

Der Einfluss der Sepsis auf den Metabolismus bei vorheriger ANG II- und Ramipril-Behandlung der Mäuse wurde durch Bilirubin und Laktatdehydrogenase analysiert. Durch diese Parameter kann ein sepsisbedingter Gewebeabbau detektiert werden. Im Vergleich zu den früheren Untersuchungen (siehe 4.1.11.2) fällt ein um 1,6 mg/dl höherer Bilirubinwert bei den sham-operierten WT-Mäusen auf. Dieser basal erhöhte Wert konnte, ausgehend von den experimentellen Konditionen, nicht erklärt werden. Bilirubin und LDH waren in den un-behandelten WT- und HZ-Mäusen nach Sepsisinduktion nicht signifikant erhöht (**Abb. 30A und 30B**). In den sham-operierten ANG II-HZ-Mäusen wurde ein erhöhter Bilirubinwert im Blutplasma im Vergleich zu den sham-operierten ANG II-WT-Mäusen gemessen (* $p < 0,05$). Die Sepsisinduktion führte in beiden Mausgruppen mit ANG II nicht zur Erhöhung von Bilirubin im Blutplasma (**Abb. 30A**). Die ANG II-Behandlung zeigte einen signifikant erhöhten LDH-Spiegel im Blutplasma der septischen WT-Mäuse (* $p < 0,05$), im Gegensatz zu den septischen HZ-Mäusen, die keinen signifikanten Anstieg von LDH aufwiesen (**Abb. 30B**). Die Ramipril-Infusion hatte keinen Effekt auf das basale Bilirubin- und LDH-Niveau, war aber in beiden Mausgruppen signifikant erhöht nach Sepsisinduktion, im Vergleich zu deren jeweiligen Kontrollen und zu den unbehandelten septischen WT- und HZ-Mäusen (**Abb. 30A und 39B**).

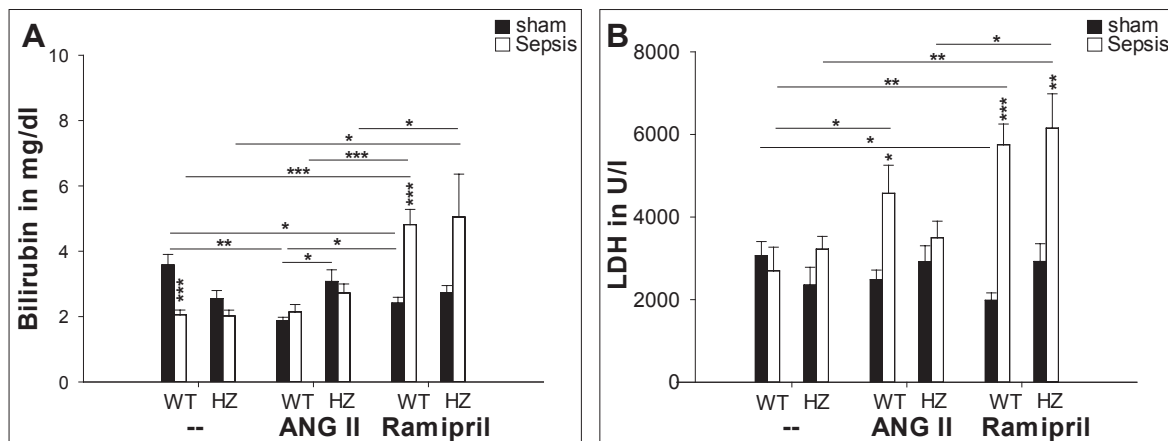
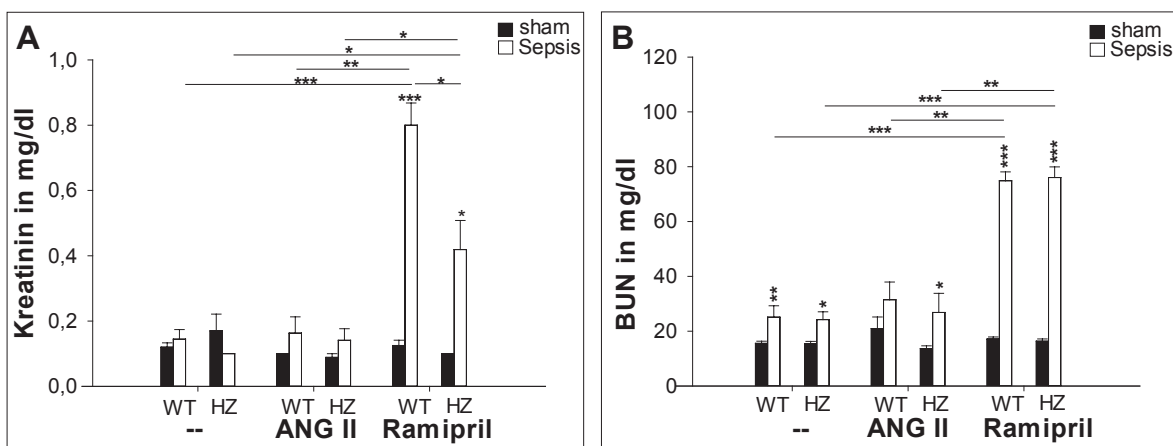


Abb. 30: Effekte der Sepsisinduktion auf Metabolismusparameter im Blutplasma. (A) Bilirubin, (B) Laktatdehydrogenase (LDH), im Blutplasma 24 h nach Sepsisinduktion. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.4 Nierenschädigung und Störungen der Nierenretention

Die Nierenschädigung, gemessen im Blutplasma mit Hilfe der Marker Kreatinin (**Abb. 31A**) und BUN (**Abb. 31B**), wurde durch die Sepsis ohne Vorbehandlung kaum beeinflusst. Im

Vergleich zu den Markerwerten aus dem ersten Versuchsteil dieser Arbeit (4.1.11.3) war die Nierenfunktion deutlich weniger beeinträchtigt. Grund dafür war wahrscheinlich die erhobene Volumentherapie 6 h nach Sepsisinduktion, welche die Nierenfunktion verbesserte. Die durch ANG II vorbehandelten Gruppen zeigten eine ähnlich geringe Störung der Retention nach Sepsis wie die entsprechenden unbehandelten septischen Mäuse. Ein sehr deutlicher Anstieg der beiden Retentionsmarker nach Sepsis wurde in beiden Mausgruppen mit Ramipril-Vorbehandlung beobachtet. Die Kreatininwerte waren bei den septischen WT-Mäusen mit Ramipril signifikant erhöht ($*** p < 0,001$). Dieser Ramipril-Effekt war bei den septischen HZ-Mäusen ($* p < 0,05$) deutlich milder wie bei den septischen WT-Ramipril-Mäuse ($* p < 0,05$) (**Abb. 31A**). BUN stieg bei beiden Ramipril-behandelten Mausgruppen auf ~ 75 mg/dl (jeweils $*** p < 0,001$). Hier konnte kein Unterschied zwischen den WT- und HZ-Mäusen festgestellt werden (**Abb. 31B**). Die Tubulusschäden, die anhand der Blutplasma NGAL-Werte gemessen wurden, waren bei allen septischen Mäusen sichtbar. Die NGAL-Spiegel stiegen bei allen septischen Mäusen auf das 15- bis 20-Fache der scheinoperierten Kontrollmäuse an (alle $*** p < 0,001$). Im Vergleich zu den septischen Mäusen ohne und mit ANG II waren die Blutplasmawerte der septischen Ramipril-Mäuse um jeweils 5-7 g/ml NGAL höher. Die septischen HZ-Ramipril-Mäuse zeigten zudem einen etwas stärkeren Anstieg von NGAL als die septischen WT-Ramipril-Mäuse (um 0,7 g/ml höher; $* p < 0,05$) (**Abb. 31C**). Die Messungen der Nierenretentionsmarker zeigten, dass Ramipril die Nierenfunktion nach Sepsis im Vergleich zu den septischen Mäusen ohne Vorbehandlung und mit ANG II-Gabe verschlechterte.



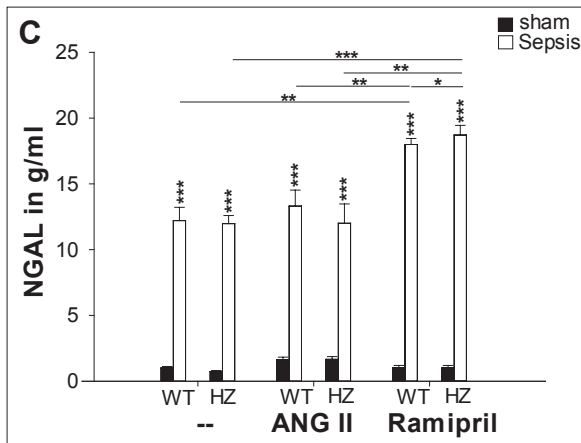


Abb. 31: Nierenretentions- und Nierenschädigungsmarker. (A) Kreatinin, (B) Blutharnstoffstickstoff (BUN) und (C) NGAL wurden im Blutplasma 24 h nach Behandlung gemessen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.5 Untersuchung des Urins zum Nachweis von Nierenschäden

Aufgrund der septischen Anurie ist es sehr schwer, quantifizierbare Urinuntersuchungen durchzuführen. Besonders bei den septischen Ramipril-Mäusen konnte nur von einem WT- und drei HZ- Mäusen Urin gewonnen werden. Es wurde aber deutlich, dass alle septischen Mäuse unabhängig von ihrer Vorbehandlung den Wert von 30 mg/g ($> \text{---}$ Mikroalbuminurie) überschritten hatten und einen glomerulären Nierenschaden aufwiesen. Unter Berücksichtigung des teilweise niedrigen Stichprobenumfangs war eine Bewertung der glomerulären Funktion anhand des ACR sehr schwierig, wobei die septischen HZ-Mäuse in allen Behandlungsgruppen einen etwas höheren ACR zeigten (**Abb. 32**).

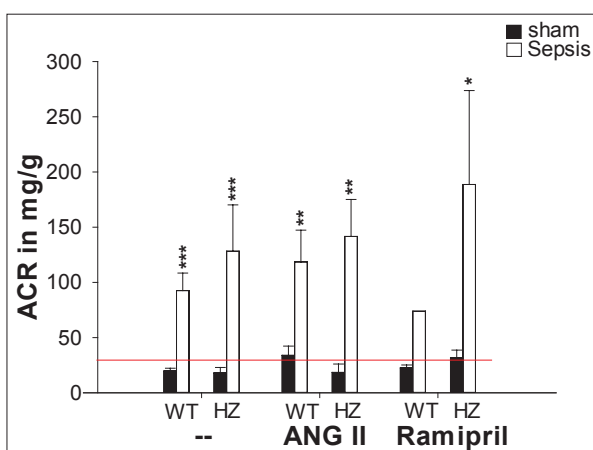


Abb. 32: Albumin-Kreatinin-Ratio. Der ACR wurde im Spontanurin der Mäuse 24 h nach Scheinoperation (sham) bzw. CLP bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; --- ACR > 30 mg/g; $n = 1-10$.

4.2.6 Histopathologische Untersuchung des Nierengewebes

Der Einfluss von ANG II und Ramipril auf das Nierengewebe nach Sepsis wurde mit Hilfe der PAS-Reaktion untersucht. Wie im ersten Versuchsteil der Arbeit (siehe 4.1.9) wurden bei den WT-Mäusen nach CLP Schädigungen in den proximalen Tubuluszellen detektiert. Es wurde ein Verlust bzw. Abflachen der Bürstensaummembran und eine Dilatation der proximalen Tubuli festgestellt (**Abb. 33**). Die Vakuolisierung war allerdings nicht so stark ausgeprägt wie im ersten Versuchsteil. Dies kann mit der zusätzlichen Volumentherapie zusammenhängen. Die HZ-Mäuse zeigten 24 h nach Sepsis ebenfalls leichte Schäden im Nierengewebe, allerdings deutlich geringer als bei den septischen WT-Mäusen. Durch die vorherige ANG II-Gabe waren die beobachteten Schäden bei den septischen WT-Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten septischen WT-Mäusen geringer. Die septischen ANG II-HZ-Mäuse zeigten ein ähnliches Schädigungsniveau wie die septischen ANG II-behandelten WT-Mäuse. Die Behandlung mit Ramipril verursachte bereits bei den Kontrollen tubuläre Schäden in den WT-Mäusen. Diese Schäden konnten in geringerem Ausmaß bei den nicht-septischen Ramipril-HZ-Mäusen beobachtet werden. Die septischen Ramipril-HZ-Mäuse wiesen zudem weniger Schäden des Nierengewebes im Vergleich zu den septischen Ramipril-behandelten WT-Mäusen auf.

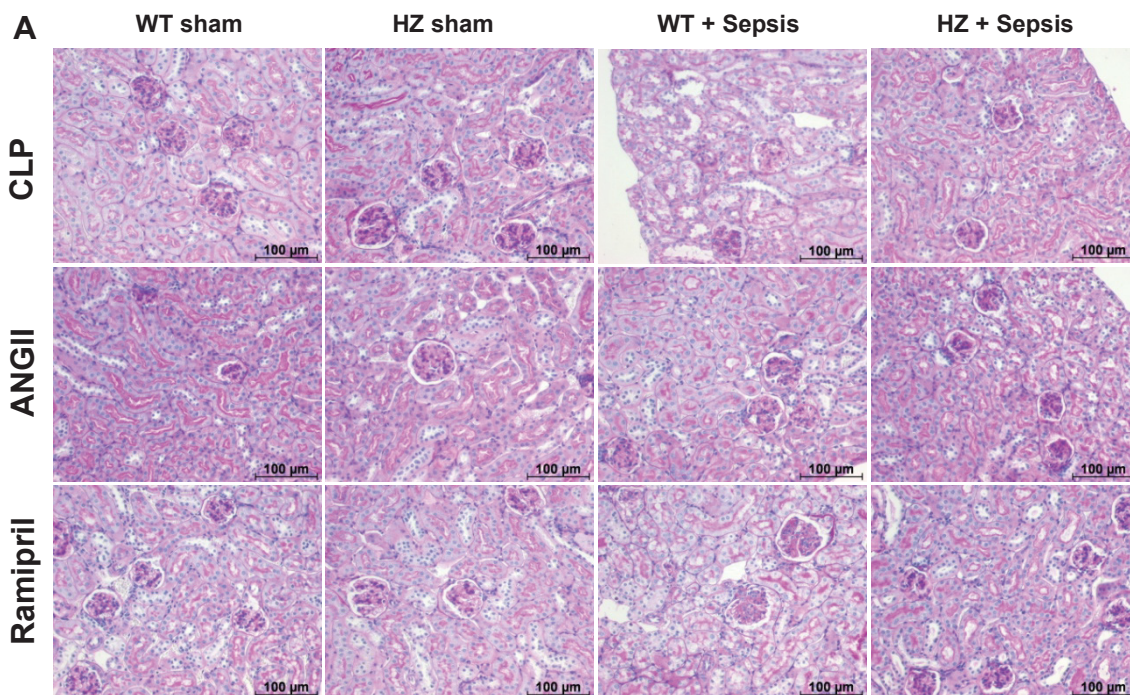
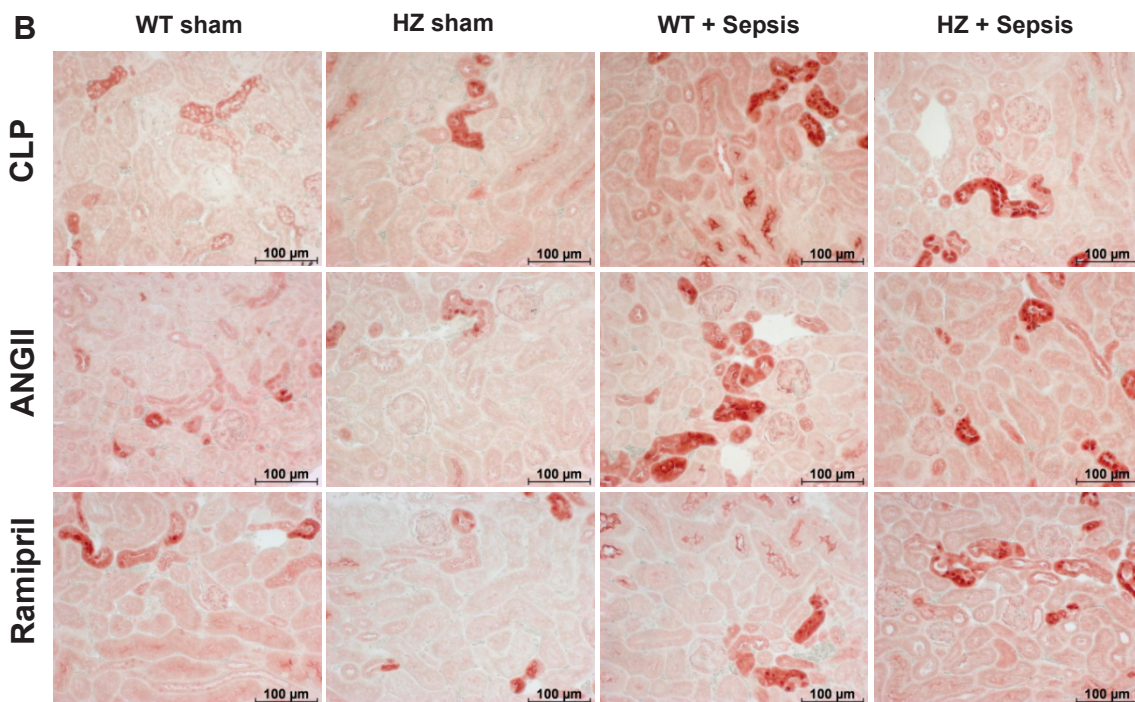


Abb. 33 PAS-Reaktion. Histopathologische Untersuchungen des Nierengewebes 24 h nach Scheinoperation (sham) bzw. CLP (200-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 100 µm). n=8-10.

4.2.7 Sepsisinduzierte Apoptose im Nierengewebe

Zur Analyse der Häufigkeit der apoptotischen Tubuluszellen wurde deren Anzahl der aktiven Caspase 3-positiven Tubuli im Nierenquerschnitt bestimmt. In dem Gewebe der scheinooperierten Mäuse konnten apoptotische Tubuluszellen detektiert werden (**Abb 34A**). Ein Anstieg der aktiven Caspase 3 nach Sepsisinduktion konnte in allen Behandlungs- und Mausmodellen, mit Ausnahme der septischen Ramipril-behandelten WT-Mäuse, gemessen werden. Dieser Anstieg war bei den HZ-Mäusen innerhalb der Behandlungsgruppen, im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen, ohne (n.s., $p=0,096$) und nach ANG II-Behandlung (* $p<0,05$) niedriger. Die septischen Ramipril-behandelten WT-Mäuse offenbarten ähnlich viele apoptotische Tubuli wie ihre Kontrollen. Die Anzahl der betroffenen Tubuli bei den septischen Ramipril-behandelten HZ-Mäusen war im Vergleich zu deren Kontrollen leicht erhöht, aber ohne Unterschied zu den unbehandelten WT-Kontrollen. Die Apoptose im Nierengewebe schien durch die Ramipril-Behandlung grundsätzlich gemindert (**Abb 34A und 34B**).



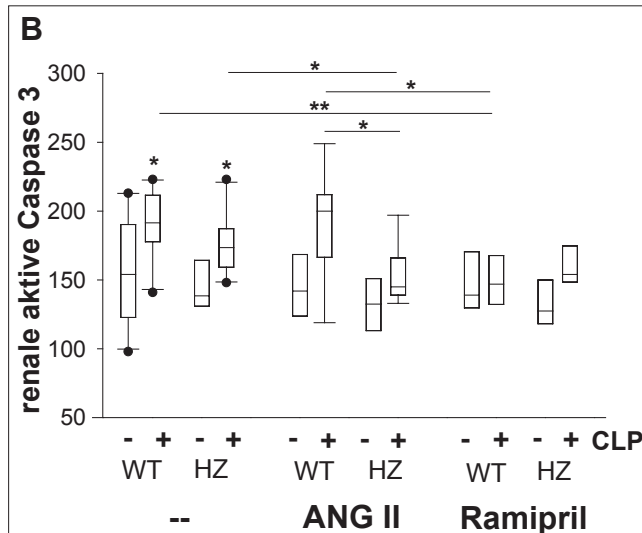


Abb. 34: Aktive Caspase 3. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse der aktiven Caspase 3 im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; I—I entsprechen 100 μ m). (B) Anzahl der aktiven Caspase 3-positiven Tubuluszellen im Nierenquerschnitt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.8 Einfluss von ANG II und Ramipril auf die *Hif-1 α* - und *Hif-2 α* -Genexpression in der septischen Niere

Unabhängig von der Vorbehandlung der Mäuse wurde in allen scheinoperierten WT- und HZ-Mäusen ein ähnliches Niveau der *Hif-1 α* -Genexpression in der Niere gemessen (**Abb. 35A**). Nach Sepsisinduktion konnte im Nierengewebe aller septischen Mäuse ein Anstieg von *Hif-1 α* verzeichnet werden. In den WT-Mäusen verursachte die Sepsis einen signifikanten Anstieg der Genexpression von *Hif-1 α* in der Niere (* $p < 0,05$). ANG II führte nach Sepsis ebenfalls zu einem deutlich höheren *Hif-1 α* -Spiegel in der Niere der WT-Mäuse (n.s.; $p = 0,061$), welcher signifikant höher (* $p < 0,05$) im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen ohne Vorbehandlung war. Die septischen Ramipril-WT-Mäuse wiesen einen zu den WT-Mäusen vergleichbaren Anstieg von *Hif-1 α* in der Niere auf (** $p < 0,001$). In den HZ-Mäusen zeigte sich eine signifikante Erhöhung von *Hif-1 α* nach Sepsisinduktion (* $p < 0,05$), wohingegen ANG II und Ramipril nach Sepsis kaum einen Einfluss auf *Hif-1 α* in den HZ-Mäusen hatte. Zwischen den septischen WT- und HZ-Mäusen mit ANG II-Vorbehandlung war dieser Unterschied signifikant (** $p < 0,01$) (**Abb. 35A**). Ein deutlicher Unterschied in den *Hif-2 α* -Genexpressions-spiegeln wurde lediglich bei den Mäusen ohne Vorbehandlung gemessen. Die sham-operierten HZ-Mäuse zeigten eine signifikant geringere *Hif-2 α* -Expression (* $p < 0,05$) als die WT-Kontrollen. Nach Sepsis stiegen die *Hif-2 α* -Spiegel in beiden Mausgenotypen auf ein ähnliches Niveau an (WT: * $p < 0,05$; HZ: ** $p < 0,01$). ANG II und Ramipril hatten keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das *Hif-2 α* -Expressionsmuster (**Abb. 35B**).

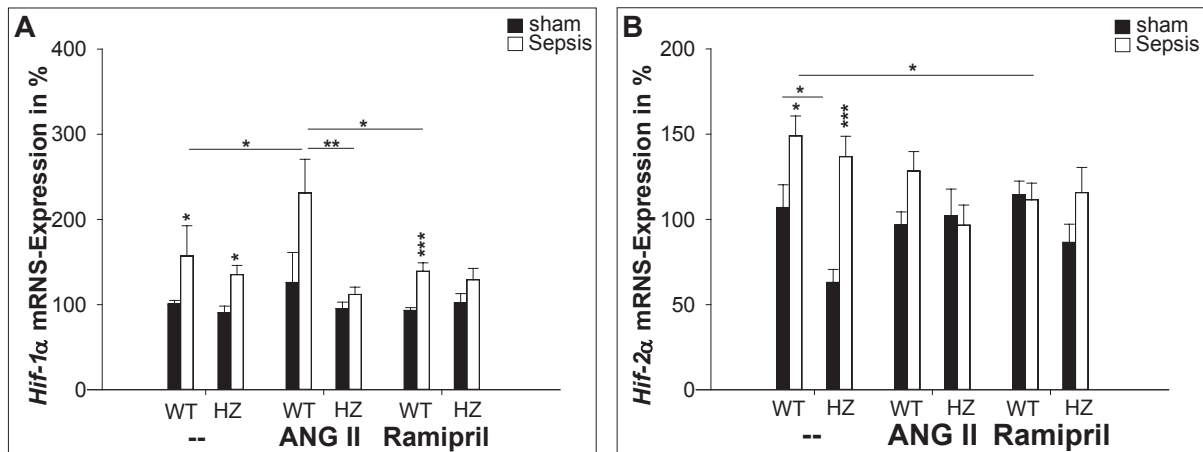


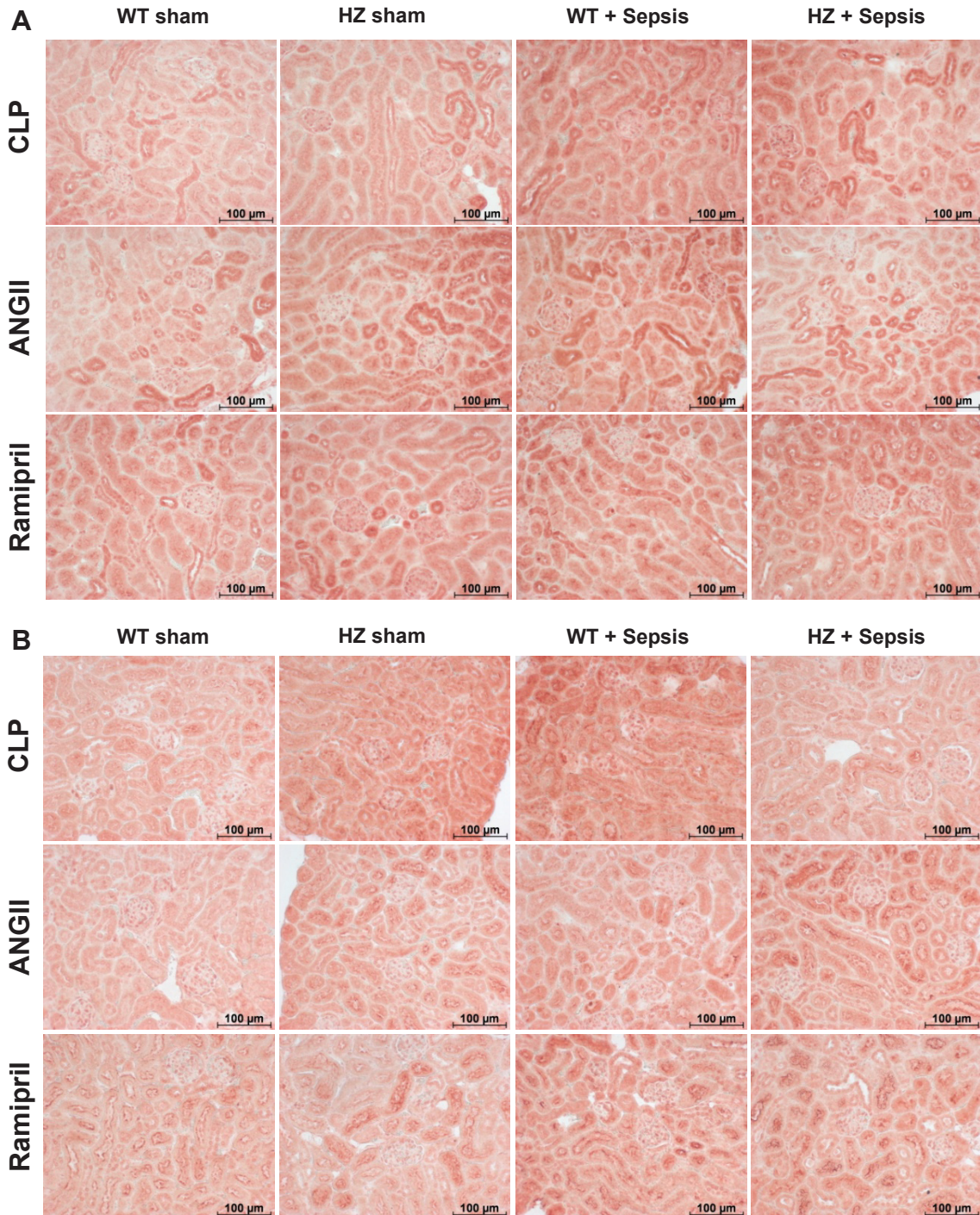
Abb. 35: *Hif-1α*- und *Hif-2α*-Genexpression. Der Genexpressionsspiegel von (A) *Hif-1α* und (B) *Hif-2α* wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den ungetriggerten WT-sham-Kontrollen normalisiert (n=8-10). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n= 8-10.

4.2.9 Proteinexpression von HIF-1α und HIF-2α in der Niere

Die HIF-1α- und HIF-2α- Proteinexpression wurde in Nierenparaffinschnitte der Versuchstiere mit Hilfe der Immunhistochemie analysiert.

Die sham-Behandlung der Mäuse mit ANG II und Ramipril zeigte unabhängig vom Genotyp eine gesteigerte renale HIF-1α-Expression im Vergleich zu ihren ungetriggerten Kontrollen (**Abb. 36A und 36C**). Die HIF-2α-Expression war nur in den nicht-septischen WT-Mäusen nach Ramipril-Behandlung signifikant erhöht (* p<0,05) (**Abb. 36B und 36D**). Bei den sham-operierten HZ-Mäusen konnte ohne Vorbehandlung und bei ANG II-Gabe ein erhöhter HIF-1α- (**Abb. 36A und 36C**) und HIF-2α-Spiegel (**Abb. 36B und 36D**) im Vergleich zu den gleichbehandelten sham-WT-Mäusen detektiert werden. Die Ramipril-Behandlung hingegen zeigte keinen Unterschied von HIF-1α und HIF-2α zwischen den WT- und HZ-Kontrollen (**Abb. 36A bis 36D**). Nach Sepsisinduktion konnte bei den ungetriggerten WT-Mäusen eine renale Hypoxie in Form von HIF-1α- (** p<0,01) und HIF-2α-Kumulation (* p<0,05) verzeichnet werden. Die septischen HZ-Mäuse wiesen nur eine leichte Zunahme von HIF-1α und eine signifikante Reduktion von HIF-2α auf (* p<0,05). Die bereits durch ANG II-bedingte HIF-1α-Akkumulation bei den WT-Mäusen wurde durch die Sepsis zusätzlich erhöht. Hingegen zeigten die ANG II-behandelten HZ-Mäuse eine signifikante Reduktion von HIF-1α im Nierengewebe (* p<0,05) nach CLP (**Abb. 36A und 36C**). Die ANG II-Behandlung beeinflusste nicht die renale HIF-2α-Proteinexpression in den septischen WT-Mäusen. Ein leichter HIF-2α-Anstieg nach Sepsis wurde bei den ANG II-HZ-Mäusen beobachtet. Damit wiesen die septischen HZ- im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen mit ANG II-Behandlung eine signifikant höhere HIF-2α-Expression auf (* p<0,05) (**Abb. 36B und 36D**). Innerhalb der bei-

den Ramipril-behandelten Mausgruppen führte die Sepsis zur erhöhten HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression (**Abb. 36A bis 36D**), mit Ausnahme von HIF-1 α bei den Ramipril-HZ-Mäusen, wo keine Änderung beobachtet wurde (**Abb. 36A und 36C**).



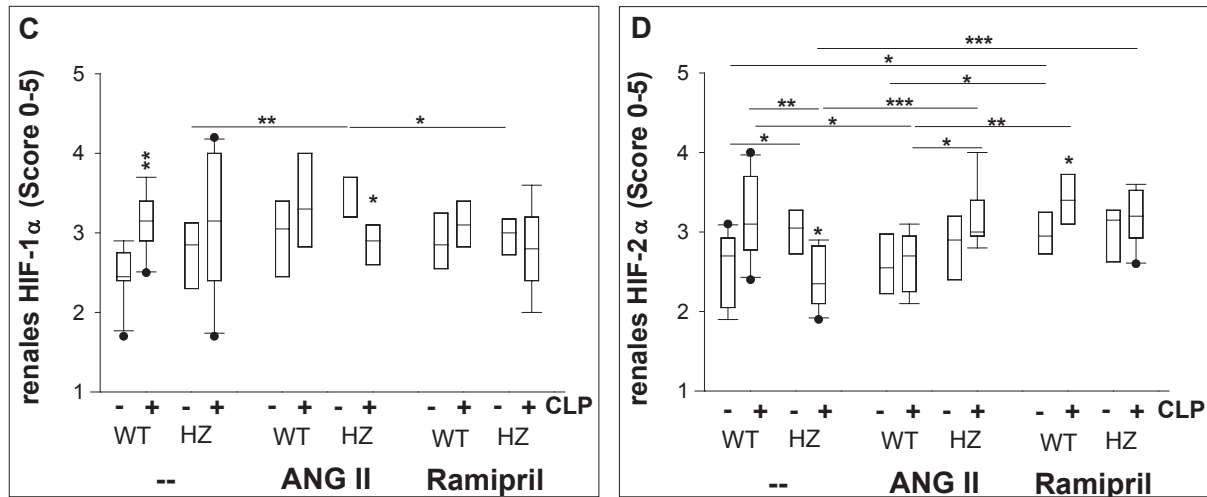


Abb. 36: Renale Proteinexpression von HIF-1α und HIF-2α. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von (A) HIF-1α und (B) HIF-2α im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; I—I entsprechen 100 µm). Relative Expression von (C) HIF-1α und (D) HIF-2α analysiert durch ein Score-System (0-5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.10 Einfluss von ANG II und Ramipril auf die *Morg1*- und *Phd3*-Genexpression in der septischen Niere

Die Expressionsmuster von *Morg1* und *Phd3* wiesen sehr deutliche Unterschiede zwischen den Mausgenotypen und den Behandlungen der Mäuse auf. Wie erwartet, war die Expression von *Morg1* bei den sham-operierten HZ-Mäusen in allen Behandlungsgruppen um ~50 % niedriger als die entsprechend behandelten sham-WT-Mäuse (**Abb. 37A**). Die WT- (* $p < 0,05$) und die HZ-Mäuse (* $p < 0,05$) ohne vorherige Behandlung zeigten eine sepsisbedingten Hochregulation von *Morg1* in der Niere. Die Untersuchung der *Morg1*-mRNS nach ANG II-Behandlung wiesen keinerlei Änderung des Expressionsmusters in beiden Genotypen auf, wohingegen eine signifikante Abnahme der *Morg1*-Expression in der Niere der Ramipril-behandelten WT- (***) $p < 0,001$) und HZ-Mäuse (* $p < 0,05$) nach CLP induzierte (**Abb. 37A**). Die Analyse der *Phd3*-mRNS zeigte eine signifikant reduzierte basale Expression in den Nieren der WT-Mäuse (***) $p < 0,001$) durch die ANG II-Behandlung, im Vergleich zu den unbehandelten WT-Kontrollen (**Abb. 37B**). Die renale *Phd3*-Expression war nach CLP in den WT- und HZ-Mäusen geringfügig gesteigert, wohingegen die ANG II-Infusion in den septischen WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der mRNS von *Phd3* führte (***) $p < 0,001$). In den septischen ANG II-HZ-Mäusen wurde nur ein leichter Anstieg des renalen *Phd3* registriert. Im Gegensatz dazu verursachte die Ramipril-Behandlung sowohl bei den WT- (***) $p < 0,001$) als auch bei den HZ-Mäusen (***) $p < 0,001$) eine signifikante Erniedrigung der Expression (**Abb. 37B**).

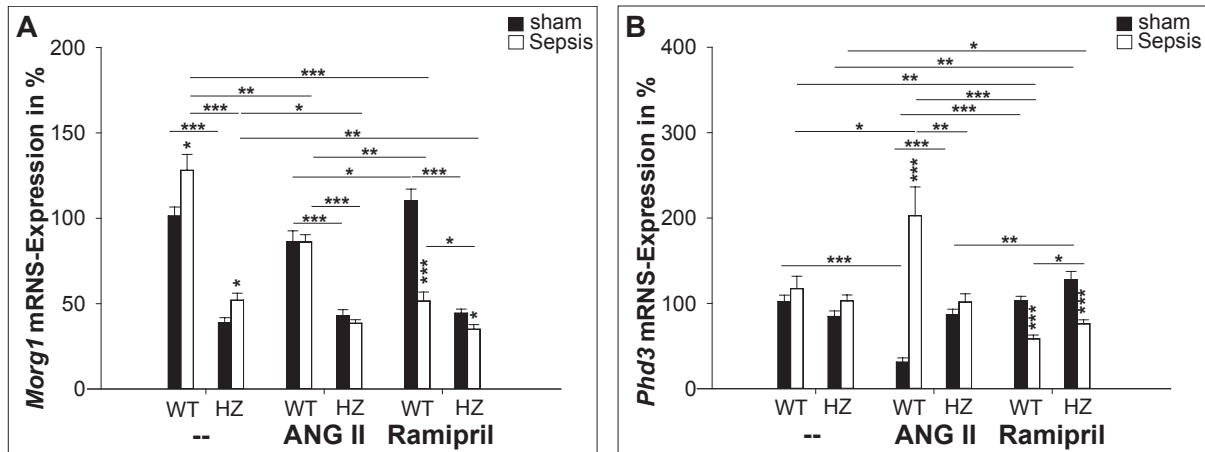
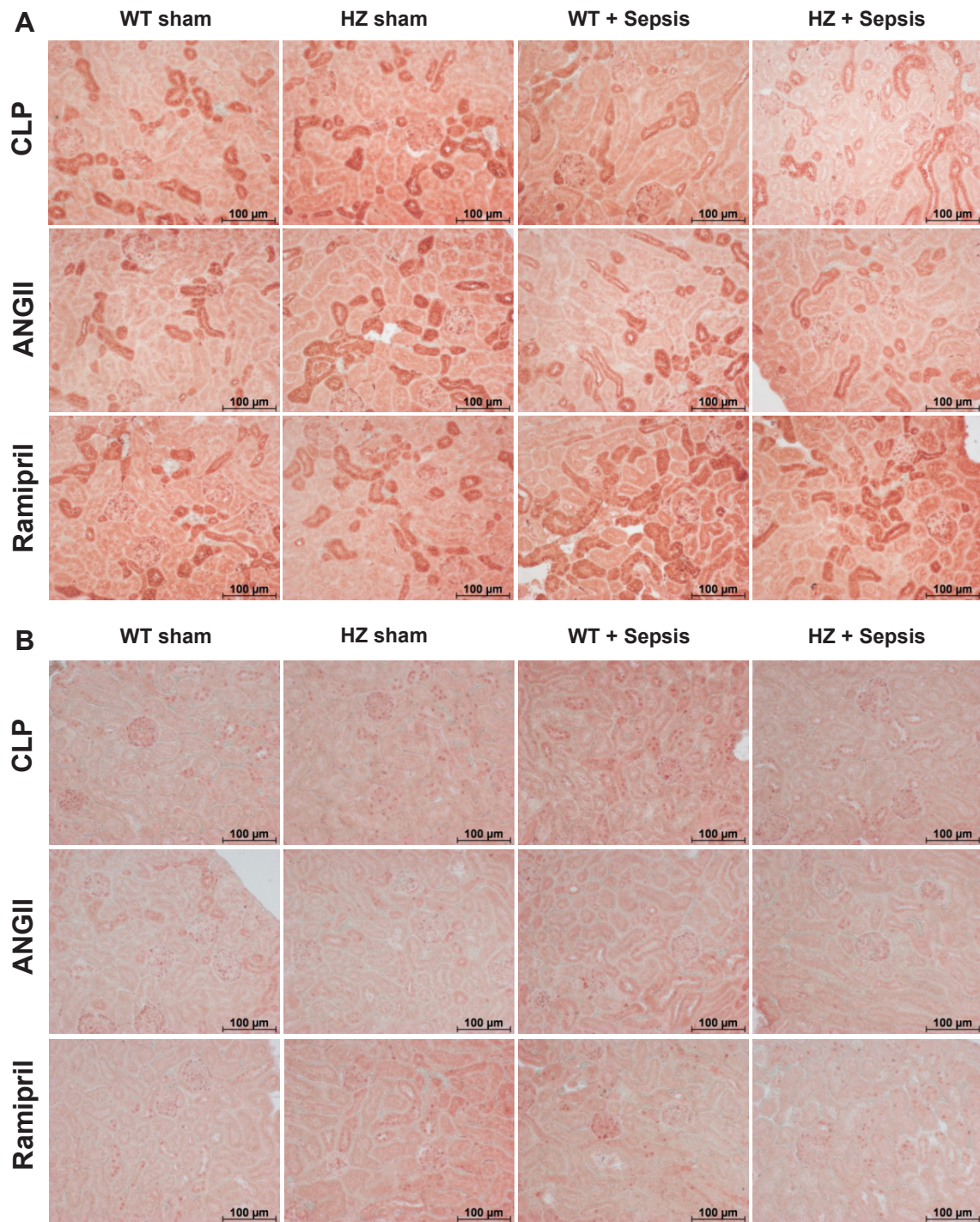


Abb. 37: *Morg1*- und *Phd3*-Genexpression. Die Genexpressionsspiegel von *Morg1* (A) und *Phd3* (B) wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den unbehandelten WT-sham-Kontrollen normalisiert (n=8-10). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n= 8-10.

4.2.11 Proteinexpression von MORG1 und PHD3 in der Niere

Die immunhistochemische Untersuchung der MORG1- und PHD3-Expression im renalen Kortex der behandelten Mäuse zeigte 24 h nach CLP nur geringe Unterschiede im Proteinexpressionsmuster. Allerdings führte die Sepsisinduktion in den unbehandelten HZ-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des kortikalen MORG1 im Vergleich zu den Kontrollen (* p<0,05) (**Abb. 38A und 38C**). Die Ramipril-Behandlung erhöhte signifikant die renale MORG1-Proteinexpression der septischen WT-Mäuse (* p<0,05) im Verhältnis zu den septischen WT-Kontrollen (**Abb. 38A und 38C**). Die ANG II-Infusion verursachte nach Sepsis im Nierenkortex der WT-Mäuse eine verminderte PHD3-Expression im Vergleich zu den septischen WT-Kontrollen (** p<0,01) und den septischen ANG II-WT-Mäusen (* p<0,05) (**Abb. 38B und 38D**). Die reduzierte *Morg1*-Expression führte in den septischen HZ-Mäusen mit ANG II zu einem signifikant geringeren Niveau von PHD3 in der Niere, verglichen mit den septischen HZ-Mäusen, die Ramipril erhielten (* p<0,05) (**Abb. 38B und 48D**).



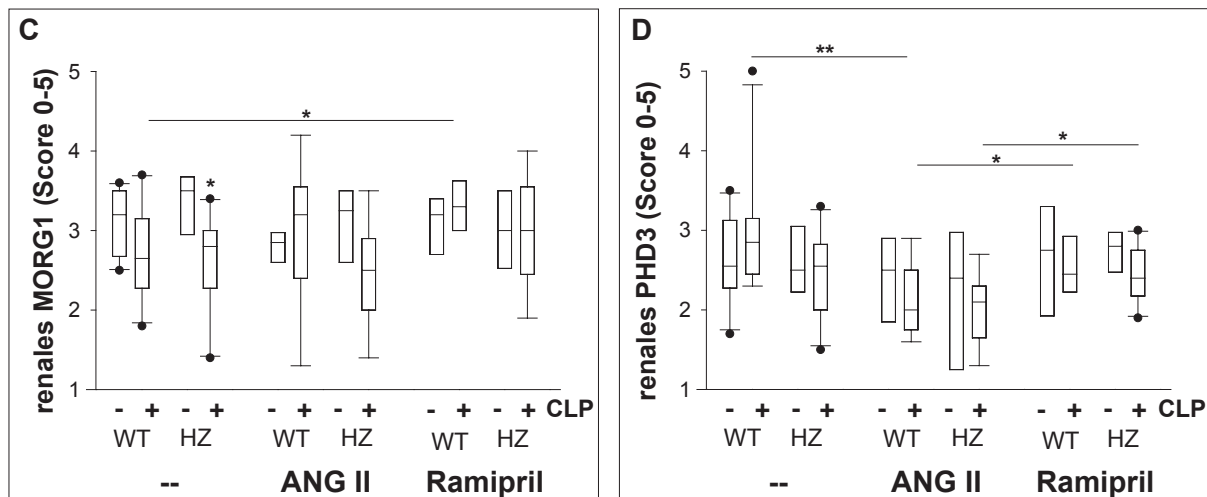


Abb. 38: MORG1- und PHD3-Proteinexpression. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von (A) MORG1 und (B) PHD3 im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 100 µm). Relative Expression von (C) MORG1 und (D) PHD3 analysiert durch ein Score-System (0-5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.12 Einfluss von ANG II und Ramipril auf die Genexpression von HIF-1 α -Zielgenen in der septischen Niere

Im Nierengewebe aller Mausmodelle wurde ein signifikanter sepsisbedingter Anstieg von *Glut1* (Abb. 39A) mit Ausnahme der septischen Ramipril-behandelten HZ-Mäuse verzeichnet. Im Verhältnis zu den anderen Behandlungsgruppen wiesen die septischen Ramipril-behandelten WT-Mäuse die höchste *Glut1*-Expression auf (** $p < 0,01$). Die Genexpression bei diesen Mäusen war signifikant höher als bei den gleichbehandelten HZ-Mäusen (** $p < 0,01$). In Tendenz zeigten die unbehandelten und ANG II-behandelten septischen HZ-Mäuse eine geringere *Glut1*-Expression als ihre septischen WT-Kontrollen (Abb. 39A). Der *Epo*-Expressionspegel lag in den Nieren der sham-HZ-Mäuse über dem der sham-WT-Mäuse (Abb. 39B). Nach Sepsisinduktion kam es zur deutlichen Erhöhung von *Epo* bei den WT-Mäusen (** $p < 0,01$). Dies wurde nur im geringen Maß bei den HZ-Mäusen beobachtet. Eine deutliche Hochregulation der *Epo*-Expression wurde bei den ANG II-behandelten HZ-Mäusen nach Sepsisinduktion (** $p < 0,01$) gemessen. Hingegen wiesen die septischen ANG II-behandelten WT-Mäuse ein reduziertes *Epo*-Niveau auf. Sowohl die septischen WT- (n.s.; $p = 0,053$) als auch die septischen HZ-Mäuse (* $p < 0,05$) mit Ramipril-Vorbehandlung zeigten 24 h nach der CLP eine geringere renale *Epo*-Expression (Abb. 39B). Die sepsisbedingten Änderungen der *Vegf*-mRNS in der Niere fielen in allen Mausmodellen gering aus. Die septischen Ramipril-WT-Mäuse zeigten als einzige eine deutliche Reduktion der renalen *Vegf*-Expression (** $p < 0,001$), welche signifikant geringer war als bei den septischen Ramipril-HZ-Mäusen (Abb. 39C).

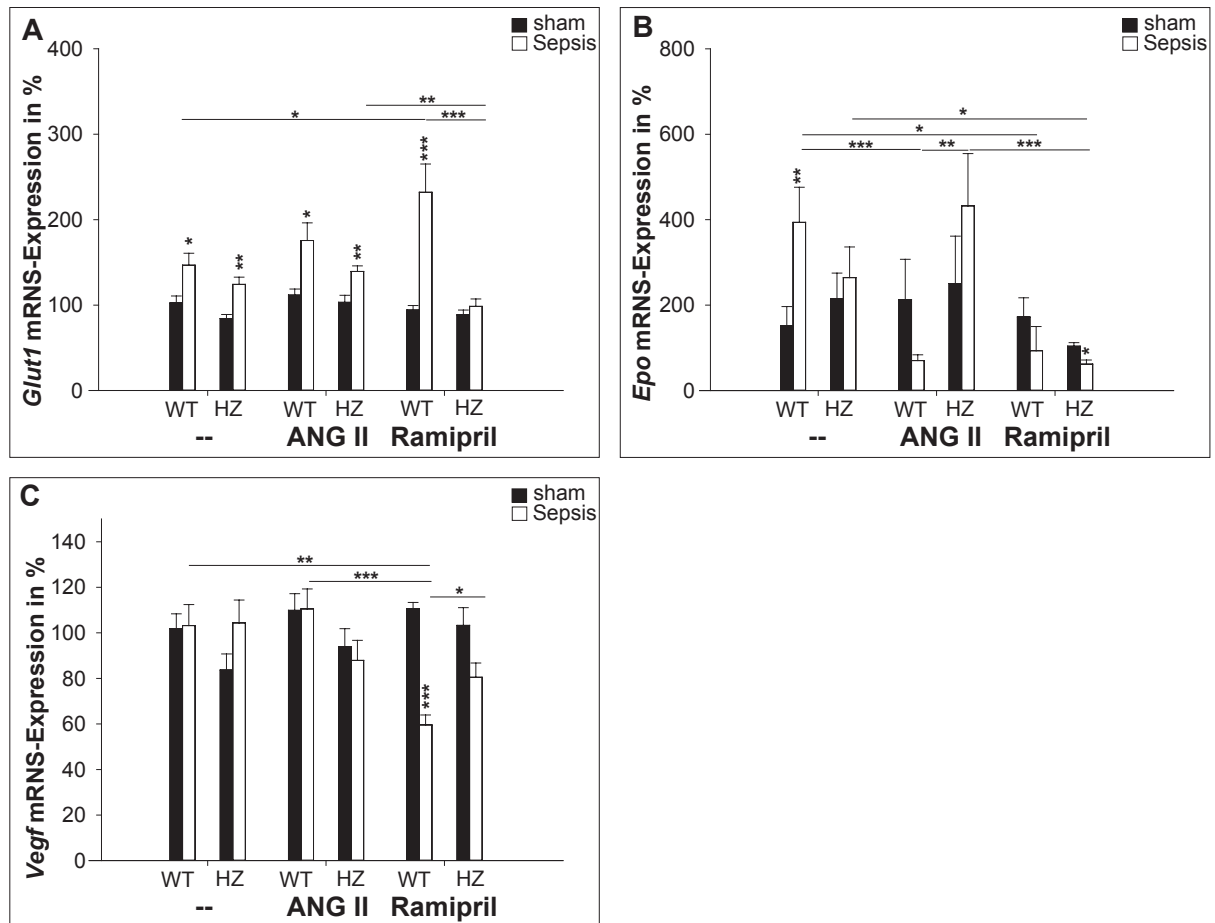


Abb. 39: *Glut1*-, *Epo*- und *Vegf*-Genexpression. Die Genexpressionsspiegel von (A) *Glut1*, (B) *Epo* und (C) *Vegf* wurden 24 h nach Sepsis- bzw. sham-Behandlung im Nierengewebe untersucht. Die Daten wurden in % relativ zu den unbehandelten WT-sham-Kontrollen normalisiert (n=8-10). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n=8-10.

4.2.13 HIF-abhängige Konzentrationen von EPO und VEGF im Blutplasma

Die Analyse der EPO- und VEGF-Konzentrationen im Blutplasma zeigten stark differente Resultate – auch innerhalb der einzelnen Gruppen. Die EPO-Expression war in den WT- und HZ-Mäusen mit ANG II- und Ramipril-Behandlung basal um 60-410 pg/ml erhöht, wobei besonders die sham-ANG II-WT-Mäuse einen höheren Wert aufwiesen (**Abb. 40A**). Eine leichte Zunahme des EPO im Blutplasma wurde sowohl bei den septischen WT- (* p<0,05) als auch bei den HZ-Mäusen (n.s.) gemessen. Die EPO-Spiegel bei den septischen ANG II-behandelten Mäusen beider Gruppen lag bei ~350 pg/ml und damit im Vergleich zu den septischen unbehandelten Mäusen höher. Anders bei den septischen Ramipril-behandelten Mäusen: Hier lag EPO in beiden Genotypen bei ~90 pg/ml und damit unterhalb der Werte der septischen unbehandelten Mäuse. Die sepsisbedingte Abnahme von EPO bei vorheriger Ramipril-Behandlung war bei den WT- (** p<0,01) und den HZ-Mäusen (** p<0,01) signifikant (**Abb. 40A**). Die Messung des plasmatischen VEGF bei den unbehandelten WT-

Kontrollen wies eine sehr starke Streuung innerhalb dieser Gruppe auf (**Abb. 40B**). Dies wurde bereits nach der CLP-Scheinoperation im ersten Versuchsteil dieser Arbeit beobachtet (4.1.7). Deutlich erhöhte VEGF-Konzentrationen wurden bei den septischen WT-Mäusen mit ANG II- und Ramipril-Behandlung gemessen. Tendenziell kam es bei den septischen HZ-Mäusen in allen drei Behandlungsgruppen zum leichten Anstieg von VEGF im Blutplasma. Die Unterschiede, die bei der Bestimmung von VEGF beobachtet wurden, waren nicht signifikant (**Abb. 40B**).

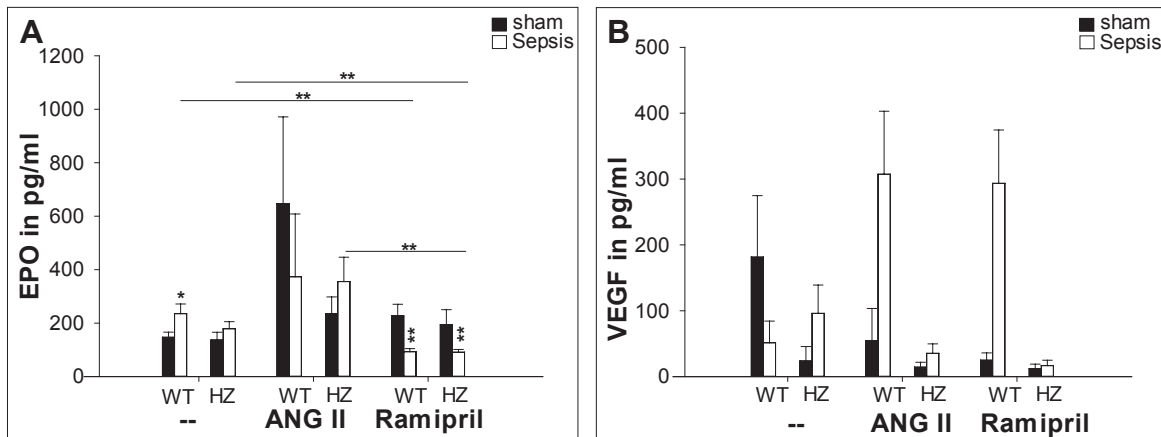


Abb. 40: EPO- und VEGF-Spiegel im Blutplasma. 24 h nach Sepsisinduktion wurden (A) EPO und (B) VEGF im Blutplasma mit Hilfe von ELISA bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 6-10$.

4.2.14 Inflammation und Sepsis

4.2.14.1 Der Einfluss von Sepsis auf die renale *Tnf α* - und *Il-1 β* -Genexpression

Zur Untersuchung der Inflammation in der Niere nach Sepsisinduktion wurden zusätzlich zum auch als Stresszytokin fungierenden *Tnf α* das proinflammatorische Zytokin *Il-1 β* betrachtet. Die Expressionsmuster beider Zytokine ähneln sich sehr stark (**Abb. 41A und 41B**). Das renale *Tnf α* -mRNS-Niveau war 24 h nach Sepsis in allen Mausmodellen signifikant erhöht (**Abb. 41A**). Die septischen HZ-Mäuse wiesen eine signifikant niedrigere renale *Tnf α* -Expression im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen ohne Vorbehandlung (** $p < 0,01$) und mit ANG II-Infusion (** $p < 0,01$) auf. Die Ramipril-Injektion hatte keinen Effekt auf die basale *Tnf α* -Expression, inhibierte aber die sepsisbedingte Hochregulation von *Tnf α* in den Nieren der WT- (** $p < 0,01$) und der HZ-Mäuse (* $p < 0,05$) im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten septischen Kontrollen (**Abb. 41A**). Mit Ausnahme der septischen ANG II- und Ramipril-behandelten HZ-Mäuse wurde auch für *Il-1 β* eine durch Sepsis verursachte signifikante Hochregulation der Expression beobachtet (**Abb. 41B**). Die *Il-1 β* -Expression war bei den septischen HZ-Mäusen im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen reduziert (ohne Behandlung: n.s.; ANG II: ** $p < 0,01$; Ramipril: ** $p < 0,01$) (**Abb. 41B**). Es wurde deutlich,

dass die *Morg1*-Reduktion in den HZ-Mäusen 24 h nach Sepsisinduktion mit einer reduzierten *Tnf α* - und *Il-1 β* -Genexpression im renalen Gewebe assoziiert ist, unabhängig von der Beeinflussung des RAAS.

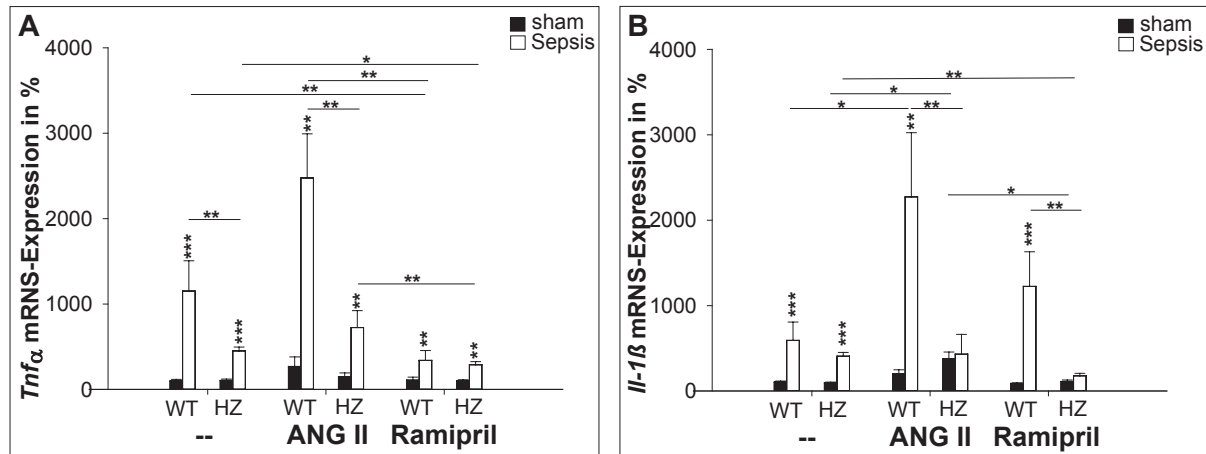


Abb. 41: *Tnf α* - und *Il-1 β* -Genexpression. Im Nierengewebe wurden 24 h nach Sepsis die Genexpression der Zytokine (A) *Tnf α* und (B) *Il-1 β* bestimmt. Die Daten wurden in % relativ zu den unbehandelten WT-sham-Kontrollen normalisiert (n=8-10). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n= 8-10.

4.2.14.2 Proteinexpression von TNF α in der Niere

Im Gegensatz zum ersten Versuchsteil, bei dem der Einfluss der PHD-Inhibitoren untersucht wurde, konnte nach CLP kein signifikanter Unterschied von TNF α im Nierengewebe festgestellt werden (Kruskal-Wallis n.s., p=0,06), welches vermutlich mit der Volumentherapie verbunden war. Jedoch wurde in den immunhistochemischen Analysen der TNF α -Expression bei allen WT-Gruppen, unabhängig von der Vorbehandlung, ein renaler TNF α -Anstieg nach Sepsisinduktion verzeichnet. Lediglich die septischen HZ-Mäuse ohne Vorbehandlung zeigten im Vergleich zu den HZ-Kontrollen eine leicht erhöhte TNF α -Expression. In der Nierenschnitten der ANG II-behandelten HZ-Mäusen wurde eine leichte Abnahme und bei den Ramipril-behandelten HZ-Mäusen keine Änderung von TNF α , im Vergleich zu den jeweiligen HZ-Kontrollen, detektiert. Die renale TNF α -Expression in den septischen HZ-Mäusen aller Behandlungsgruppen war, verglichen mit den septischen WT-Mäusen mit derselben Vorbehandlung, reduziert (Abb. 42A und 42B).

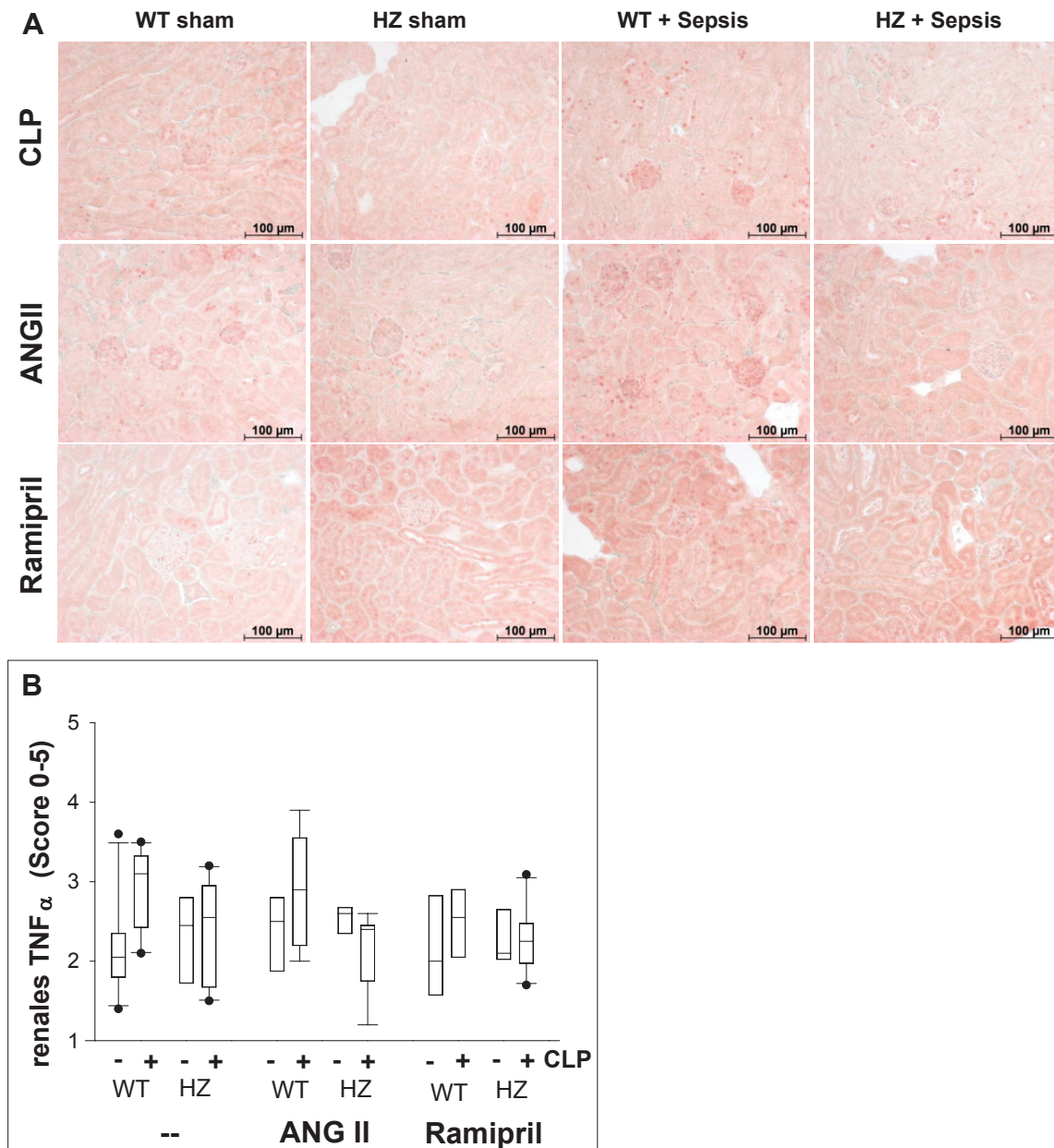


Abb. 42: Renale Proteinexpression von $TNF\alpha$. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von $TNF\alpha$ im Nierenschnitt (200-fache Vergrößerung; |—| entsprechen 100 μm). (B) Relative Expression von $TNF\alpha$ analysiert durch ein Score-System (0-5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8-10$.

4.2.14.3 Sepsisbedingte Zellinfiltration ins renale Gewebe

Die sepsisbedingte T-Zellinfiltration im interstitiellen renalen Gewebe wurde durch die Charakterisierung der CD3-Färbung bestimmt.

Die stärkste CD3-Färbung in diesem Versuchsaufbau fand im Nierengewebe der unbehandelten WT-Mäuse nach Sepsis statt (* $p < 0,05$). Im Vergleich dazu wurde eine signifikant geringere T-Zellzahl bei den septischen unbehandelten HZ-Mäusen (** $p < 0,01$) beobachtet. Der Einfluss auf das RAAS hatte deutliche Auswirkungen auf das Ausmaß der T-Zellin-

filtration im septischen Nierengewebe. Die septischen ANG II-WT-Mäuse (n.s.) und die septischen Ramipril-WT-Mäuse (* $p < 0,05$) wiesen eine geringere Infiltration als die septischen Kontroll-WT-Mäuse auf. Die septischen HZ-Mäuse beider Behandlungsgruppen zeigten ebenfalls eine deutlich geringere Infiltration verglichen mit den jeweiligen septischen WT-Mäusen. Allerdings konnte kein Unterschied innerhalb der septischen HZ-Mausgruppen in Abhängigkeit von der Behandlung detektiert werden (**Abb. 43A und 43B**).

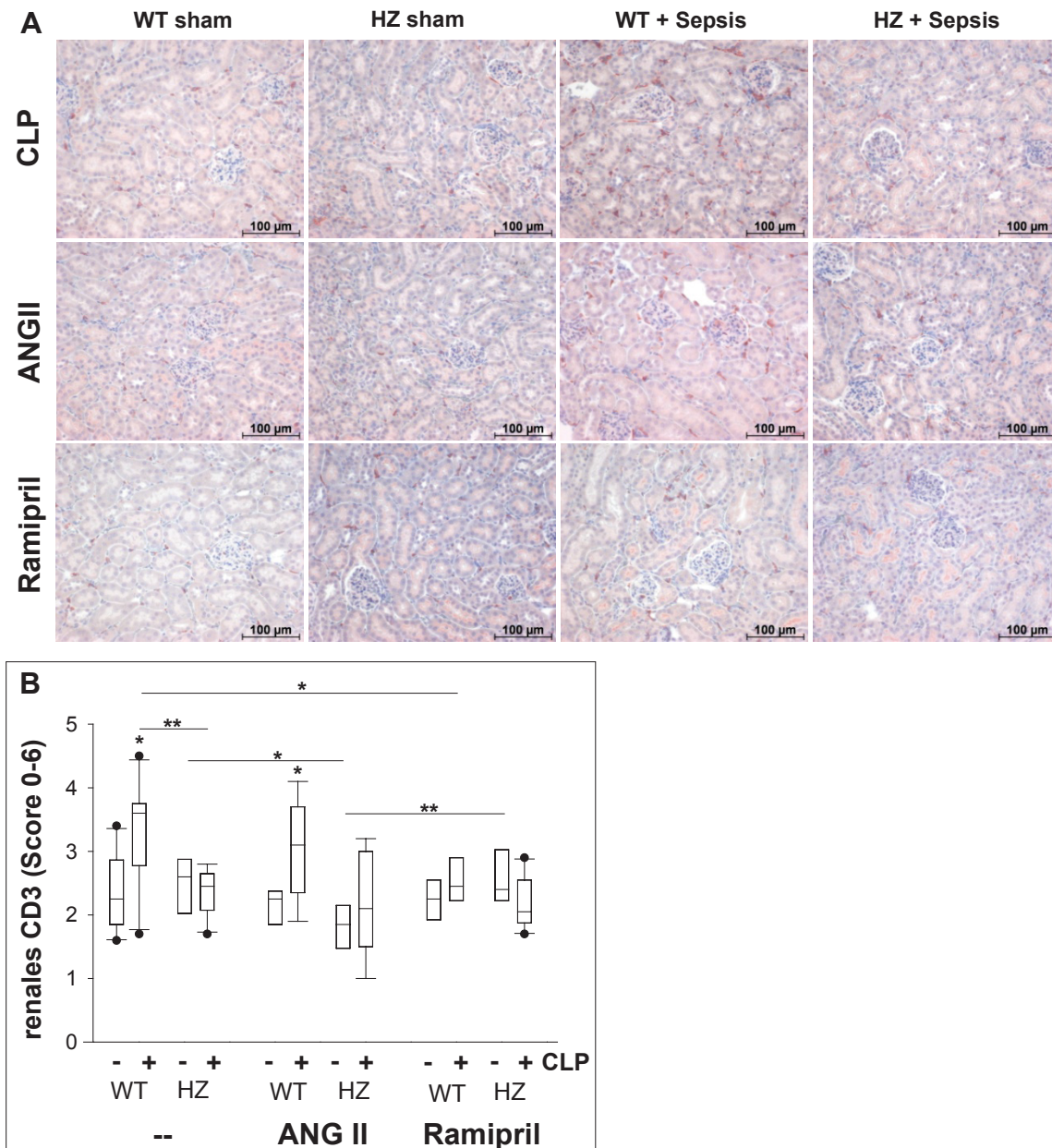


Abb. 43: CD3-Färbung im Nierengewebe. (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von CD3 im paraffinierten Nierengewebe, die zur Detektion der T-Zellinfiltration diente (200-fache Vergrößerung; I—I entsprechen 100 μ m). (B) Relative Expression von CD3 analysiert durch ein Score-System (0-6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n=8-10.

5. Diskussion

Eine schwere Sepsis kann zum multiplen Organversagen führen, in der das AKI eine große Rolle spielt. Die Mortalität ist bei AKI während der Sepsis deutlich erhöht [Mehta et al. 2010, Schrier und Wang 2004]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der HIF-Signalweg sowohl bei Sepsis [Peyssonnaud et al. 2007, Kiss et al. 2012] als auch beim AKI [Hammerschmidt et al. 2009, Hill et al. 2008] involviert ist. MORG1 ist als Scaffold-Protein im MAPK-Signalweg [Vomastek et al. 2004, Kolch 2005] und von PHD3 bekannt [Hopfer et al. 2006]. Durch seine komplexbildende Eigenschaft zum Bindungspartner PHD3 führt es zu dessen Stabilisierung und damit zur verminderten Degradation von HIF [Hopfer et al. 2006]. Die Reduktion von MORG1 im HZ-Mausmodell führte zu geringeren Nierenschäden im Ischämie-/Reperfusionmodell aufgrund der Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α [Hammerschmidt et al. 2009]. Zu den Bindungspartnern von MORG1 gehören aber auch ERK, MEK, MP1 und Raf-1 [Vomastek et al. 2004, Kolch 2005]. Die Phosphorylierung von ERK kann unter anderem über die Angiotensinrezeptoren induziert werden, bei dem MORG1 involviert ist [Wolf et al. 2003, Dhanasekaran et al. 2007]. ANG II führt zudem zur Erhöhung der renalen HIF-1 α -Expression [Wolf 2005].

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von HIF-1 α , HIF-2 α und MORG1 auf das durch sepsisinduzierte AKI zu untersuchen. Die Auswirkung der medikamentösen HIF- α -Stabilisierung durch 3,4-DHB, einem PHD-Inhibitor, wurde in dieser Arbeit in den WT-Mäusen analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von ANG II bzw. die Inhibition des Angiotensinogen-Converting-Enzyms bei sepsisbedingter Nierenschädigung im WT- und HZ-Mausmodell untersucht. In der ursprünglichen Hypothese dieser Arbeit wurde postuliert, dass eine Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α zur Verbesserung der septischen Nierenschädigung führen kann.

5.1 Einfluss von PHD-Inhibitoren bei sepsisinduzierter Nierenschädigung

Zur Untersuchung der Auswirkung der HIF- α -Stabilisierung wurden WT-Mäuse nach Sepsisinduktion ohne bzw. mit Applikation des PHD-Inhibitors 3,4-DHB analysiert. Dieser Inhibitor verhindert dabei die Hydroxylierung der HIF- α 's durch die PHD's und mindert so die Degradation der HIF- α 's [Warnecke et al. 2003]. Dadurch sollte eine basale Erhöhung der HIF- α -Expression erreicht werden, bevor die Mäuse einer Sepsis- bzw. Endotoxämie-Induktion unterzogen wurden. Durch HIF-1 α und HIF-2 α wird eine große Vielzahl an Genen reguliert, die zur möglichen Kompensation der Sepsisfolgen exprimiert werden. Die Stabilisierung der

HIF- α 's, wird durch die drei PHD-Isoformen reguliert, welche in den verschiedenen Geweben und bei den verschiedenen Zielgenen kooperieren und sich kompensieren. Minamishima et al. zeigten in vivo eine Kooperation und Kompensation von PHD2 und PHD3 bei der Regulierung von HIF- α , wobei sich der Grad der Kompensation in Abhängigkeit von den Zielgenen und dem Gewebe unterschied [Minamishima et al. 2009]. Daher wurde nicht nur ein PHD3-spezifischer Inhibitor für unseren Versuch verwendet, sondern mit 3,4-DHB ein Inhibitor, der die Aktivität aller PHD's blockiert.

5.1.1 Verringerung der Degradation von HIF-1 α und HIF-2 α durch den PHD-Inhibitor

Die immunhistochemischen Proteinexpressionsdaten konnten eine Anreicherung von HIF-1 α und HIF-2 α im Nierenkortex nach 3,4-DHB-Behandlung in den scheinerkrankten Mäusen (Abb. 9A bis 9D - CLP) detektieren. Allerdings konnte in den Nieren der Kontrollmäuse im LPS- und PCI-Modell 28 h nach Inhibitorinjektion keine Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α gezeigt werden (Abb. 9A bis 9D - LPS und PCI). Die immunhistochemischen Daten wurden durch Western Blot-Analysen zusätzlich verifiziert. Die HIF-1 α -Expriemierung der Kontrollmäuse als auch der septischen Mäuse im Western Blot entsprachen im CLP- und LPS-Modell den immunhistochemischen Daten (Abb. 9 (A) und (C) vs. Abb. 12 - HIF-1 α). Eine deutliche Diskrepanz zwischen den Western Blot- und den immunhistochemischen Befunden wurde bei den PCI-behandelten Mäusen sichtbar. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei immunhistochemischen Untersuchungen der Kortex betrachtet wurde, während im Western Blot ein Teil des gesamten Nierengewebes mit Medulla verwendet wurde. Es sind keine Daten zur Proteinexpression in der Niere zu einem früheren Zeitpunkt dieser Versuchsreihe bekannt. Dies macht es schwer zu beurteilen, ob die zu erwartende Akkumulation nach LPS und PCI von HIF-1 α und HIF-2 α bereits wieder gemindert war. Bei Untersuchungen verschiedener PHD-Inhibitoren durch Warnecke et al. konnte in der Medulla des Nierengewebes der Ratte nach Injektion von 3,4-DHB ebenfalls keine Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α detektiert werden. Allerdings zeigte sich durch 3,4-DHB eine deutliche Stimulation der Angiogenese, welche durch Zielgene des HIF-1 α -Signalweges aktiviert wird [Warnecke et al. 2003]. In Zellversuchen konnte vor allem für 3,4-DHB ein deutlicher HIF-1 α -Stabilisierungseffekt 24 h nach PHD-Inhibition beobachtet werden [Warnecke et al. 2003]. Die Untersuchungen der Genexpression von *Hif-1 α* und *Hif-2 α* (Abb. 8A und 8B) in den Kontrollmäusen 28 h nach 3,4-DHB-Injektion zeigte eine reduzierte Expression der beiden Gene. Durch das Protein HIF-1 α werden die Gene von mTOR und der PHD's aktiviert, die wiederum die Induktion der Genexpression von *Hif-1 α* limitieren bzw. die Degradation von HIF-1 α

injizieren. Das mTOR ist für die Genexpression von *Hif-1 α* verantwortlich und limitiert bei gesteigertem HIF-1 α -Spiegel eine „überschießende“ hypoxische Reaktion [Demidenko und Blagosklonny 2011, Wouters und Koritzinsky 2008]. PHD3 ist ein HIF-Zielgen, welches bei Hypoxie induziert wird [sabiosciences]. Es wird vermutet, dass PHD3 durch diesen Feedbackloop daran beteiligt ist, die HIF-Antwort durch die Degradation von HIF- α bei anhaltender Hypoxie zu unterdrücken [Marxsen et al. 2004, Stiehl et al. 2006, Appelhoff et al. 2004, Aprelikova et al. 2004]. Die Ursache für die in dieser Arbeit analysierte reduzierte Genexpression von *Hif-1 α* und *Hif-2 α* und der nach 28 h geringen HIF-1 α - und HIF-2 α -Proteinstabilisierung in der Niere könnte daher vermutlich im PHD-HIF Feedbackloop liegen. Eine gesteigerte Genexpression von *Phd3* (Abb. 10B) und Proteinexpression von PHD3 (Abb. 11B und 11D) konnte allerdings 28 h nach Inhibitorbehandlung nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt könnte diese Hypothese bestätigen. Im Gegenteil wurde 28 h nach Inhibitorbehandlung eine signifikant verminderte Genexpression von *Phd3* in der Niere bei den NaCl-injizierten Kontrollmäusen festgestellt. Dies lässt vermuten, dass eine Blockierung der PHD-Enzymaktivität bzw. die zum früheren Zeitpunkt vermutete PHD3-Proteinerhöhung im Feedbackloop eine geminderte Expression der eigenen Gene verursacht. Einen zusätzlichen Nachweis der geminderten HIF-1 α und HIF-2 α -Degradation könnte eine Überprüfung der Aktivität der PHD's bringen.

Zum Nachweis der reduzierten Degradation der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α durch den PHD-Inhibitor 3,4-DHB wurde zusätzlich die Genexpression der HIF- α -Zielgene *Glut1*, *Vegf* und *Epo* sowie die Blutplasmakonzentration von EPO und VEGF untersucht. Die Genexpressionsdaten zeigten 24 h nach den sham-Behandlungen bzw. 28 h nach 3,4-DHB-Injektion keinerlei Unterschiede bei den drei gemessenen Zielgenen. Eine Genexpressionserhöhung könnte bereits 28 h nach Inhibitorgabe wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt sein. Dafür sprechen die erhöhten Blutplasmakonzentrationen von VEGF und EPO in den sham-PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen (Abb. 14A und 14B). Ein möglicher Feedbackloop auf die Genexpression aufgrund der gesteigerten Blutplasmakonzentration würde dies erklären. Aufgrund der erhöhten VEGF- und EPO-Konzentration im Blutplasma kann daher indirekt von einer verringerten Degradation und Aktivierung von HIF- α ausgegangen werden.

5.1.2 Sepsisbedingte renale HIF-1 α - und HIF-2 α -Akkumulation

Hypoxie spielt bei septischer AKI eine große Rolle [Yasuda et al. 2006]. Durch die Stabilisierung von HIF- α wird die Leistung zur Sauerstoffbereitstellung, anaerobe Energiegewinnung und Energieeinsparung bei reduziertem Sauerstoffangebot [Semenza 2003, Maxwell 2005] gesteigert. Die Induktion von HIF- α durch Hypoxie ist ein adaptiver Mechanismus, um ver-

minderten Sauerstoffbedingungen entgegenzuwirken. Eine renale Hypoxie konnte in beiden Mausgruppen nach CLP- und PCI-Sepsisinduktion in Form einer HIF-1 α - und HIF-2 α -Akkumulation im Kortextbereich der Niere immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die WT-Mäuse, die einer Endotoxämie unterzogen wurden, zeigten lediglich eine Erhöhung von HIF-2 α (Abb. 9). Die endotoxämischen Mäuse mit PHD-Inhibitor wiesen eine renale Hypoxie mit gesteigertem HIF-1 α und HIF-2 α auf. Mit Ausnahme einer signifikant höheren HIF-1 α -Proteinexpression nach LPS zwischen den Inhibitor-behandelten und WT-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied von HIF-1 α und HIF-2 α zwischen den Mausgruppen 24 h nach CLP, LPS oder PCI gemessen werden (Abb. 9). HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung fand durch den Einsatz von 3,4-DHB zwar statt (5.1.1), war in den Nieren der beiden Mausgruppen 24 h nach Sepsis auf ein etwa gleich hohes Niveau angestiegen. Eine Veränderung der Nierenmorphologie ist daher nur auf die basale HIF-1 α - und HIF-2 α -Stabilisierung vor der Sepsisinduktion zurückzuführen und lässt einen zeitlich verschobenen Mechanismus der Nierenschädigung vermuten.

Unerwartet war, dass im Kortext der Niere trotz veränderter HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression nach Sepsis keine signifikante Änderung bei PHD3 und MORF1 beobachtet wurde. Als Regulatoren des HIF-Signalweges wäre eine Erhöhung zur Kompensation der Hypoxie bei „überschießender“ Reaktion oder eine Reduktion, um eine HIF- α -abhängige Signaltransduktion zu verstärken, zu erwarten gewesen.

5.1.3 Verminderung sepsisbedingter Dilatation und Apoptose im Nierengewebe durch Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α

In anderen Arbeiten wurde eine sepsisinduzierte Vakuolisierung und Dilatation der proximalen Tubuluszellen und ein Abflachen der Bürstensaummembran beobachtet [Doi et al. 2009a]. Dies konnte mit Hilfe der PAS-Reaktion im septischen Nierengewebe der WT-Mäuse nachgewiesen werden. Die Behandlung der Mäuse mit dem PHD-Inhibitor verringerte diese renalen Schäden nach CLP- und PCI-Sepsisinduktion. Endotoxämie verursachte in beiden Mausgruppen 24 h nach LPS-Injektion keine Gewebeveränderung. Bei den zwei Peritonitismodellen CLP und PCI handelt es sich um polymikrobielle Sepsis, wohingegen durch LPS lediglich eine Endotoxämie ausgelöst wurde. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und wird vor allem zur Untersuchung proinflammatorischer Zytokine verwendet, da es primär Auswirkungen auf die angeborene Immunreaktion hat. Die Applikation von LPS weist zwar Charakteristika eines septischen Krankheitsverlaufes auf, allerdings ohne die Komplexität einer humanen Sepsis zu reproduzieren. Daher kann die LPS-Endotoxämie nicht als Sepsismodell angesehen werden. Zur Charakterisierung der renalen Apoptose wurden der TUNEL-Assay zur Bestimmung der DNS-Schäden und die

Caspase 3-Färbung zur Analyse einer Protease des Apoptose-Signalweges durchgeführt. Der TUNEL-Assay zeigte eine durch CLP, LPS und PCI ausgelöste DNS-Schädigung in beiden Mausgruppen unabhängig von der Vorbehandlung mit oder ohne PHD-Inhibitor. Dass durch LPS renale DNS-Schäden ausgelöst werden, wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays bereits früher publiziert [Guo et al. 2004]. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der Stärke der DNS-Schädigung zwischen den WT- und Inhibitor-behandelten Mäusen festgestellt werden. Die Beobachtungen der aktiven Caspase 3 im Nierengewebe zeigte eine verminderte Apoptose in den Inhibitor-behandelten Mäusen nach CLP, LPS und PCI. Dass eine Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α einer Schädigung im renalen Gewebe positiv entgegenwirkt, konnte bereits in anderen AKI-Modellen nachgewiesen werden [Hammerschmidt et al. 2009, Hill et al. 2008]. Ischämische und septische AKI unterscheiden sich voneinander. Dies wurde z.B. durch Dear et al. mit Hilfe der Magnetresonanztomographie dargestellt. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die septische AKI im Verlauf und der Ausdehnung, als auch im histologischen Muster verschiedenartig zur ischämischen AKI war [Dear et al. 2005]. Auch andere Studien berichten in der septischen AKI von völlig verschiedenen molekularen Mechanismen als bei nicht-septischer AKI. Pathophysiologisch wird eine Verschiebung von renaler Vasokonstriktion, Ischämie und akuter tubulärer Nekrose hinzu heterogener Vasodilatation, reaktiver Hyperämie und akuter tubulärer Apoptose beobachtet [Kockara und Kayatas 2013]. Diese Dilatation und Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es konnte wie im ischämischen AKI-Modell gezeigt werden, dass eine prä-septische Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α eine geringere Schädigung des Nierengewebes und eine verminderte renale Apoptose zur Folge hatte.

Vergleichbar der Hammerschmidt et al. [Hammerschmidt et al. 2009] und der Hill et al. [Hill et al. 2008] Studien konnte eine protektive Wirkung einer stabilisierten renalen HIF-1 α und HIF-2 α -Expression auf AKI belegt werden.

5.1.4 Reduzierte Immunantwort nach Sepsis durch PHD-Inhibitor-Behandlung

Innerhalb der ersten 24 h nach Infektion produzieren T-Zellen proinflammatorische Zytokine, welche eine zeitige Immunreaktion gegen bakterielle Infektion erhöht [Georgiev et al. 2013, Herman et al. 1991, van Schaik und Abbas 2007]. Untersuchungen der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α im Blutplasma zeigten 24 h nach LPS und PCI im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen eine tendenziell niedrigere Expression in den septischen Mäusen mit PHD-Inhibitor (Abb. 15). Die IL-6-Reduktion war am stärksten im LPS-Modell bei den Mäusen mit dem PHD-Inhibitor, verglichen mit den WT-Mäusen, ausgeprägt. Nach CLP konnte kein Unterschied von IL-6 und TNF α zwischen den septischen Mausgruppen festge-

stellt werden. Ein Einfluss des scheinoperativen Eingriffes ist nicht auszuschließen. 24 h nach Sepsis bzw. Endotoxämie konnte kein physiologisch relevanter Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Zytokinkonzentration nachgewiesen werden. Deshalb wäre eine Betrachtung der Blutplasmaspiegel 1-4 h nach Sepsis wichtig. Dies war im vorliegenden Projekt zunächst nicht vorgesehen, so dass nur stichprobenhaft Blutplasmawerte von den WT-Mäusen 1 h nach Induktion bestimmt werden konnten. Diese Analyse konnte zeigen, dass der $\text{TNF}\alpha$ -Blutplasmaspiegel der WT-Mäuse 1 h nach LPS und PCI deutlich erhöht war (Abb.15). Han et al. zeigten bereits, dass der Peak der durch Sepsis bzw. Endotoxämie ausgelösten $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung im frühen Stadium des Krankheitsbildes liegt [Han et al. 2012]. Die Messung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnte eine leichte Erhöhung der Expression 1 h und 24 h nach LPS und PCI detektieren (Abb.15). Dieser Anstieg entsprach zu den gemessenen Zeitpunkten nicht den für eine Sepsis bekannten physiologisch relevanten Werten [Dahlke et al. 2011], welche ein „Überschießen“ der Entzündungsreaktion verhindern soll. Einen besseren Einblick sollte die Analyse der mRNS-Expression der proinflammatorischen Zytokine 4h nach Sepsisinduktion im Blut bringen (Abb.16). Eine tendenziell niedrigere Genexpression von *Tnf α* , *Il-1 β* und *Inf γ* wurde nach CLP und PCI in den septischen Mäusen mit PHD-Inhibitor-Behandlung nachgewiesen. Lediglich im PCI-Modell war die *Tnf α* -Expression der PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse signifikant niedriger im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abb.16). Die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α nach PHD-Inhibitor-Behandlung führte zur reduzierten T-Zellaktivierung. Die deutlich höhere *Il-2*-Genexpression in den Peritonitismodellen CLP und PCI bei den PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen bestärkt die Vermutung einer reduzierten T-Zellaktivierung. IL-2 wirkt vor allem autokrin und verursacht damit die Aktivierung und Teilung der T-Zellen. Der verminderten T-Zellaktivierung durch die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α sollte durch die autokrine IL-2-abhängige T-Zellaktivierung entgegen gewirkt werden. Georgiev et al. wiesen nach, dass eine Deletion der HIF-1 α -Isoform I.1 zum Anstieg der proinflammatorischen Zytokine im Blutplasma führte [Georgiev et al. 2013], was invers zu den Daten dieser Arbeit einhergehen würde. Allerdings zeigten Kiss et al. bei *Phd3*^{-/-}-knockout-Mäusen, welche stabilisierte Spiegel von HIF-1 α aufwiesen, erhöhte proinflammatorische Serum-Zytokinspiegel [Kiss et al. 2012]. Es wurde eine Erhöhung der NF- κ B-vermittelten angeborenen Immunantwort nachgewiesen. Die NF- κ B-Expression wurde in den PHD-Inhibitor-Experimenten zwar nicht bestimmt, allerdings kann im Gegensatz zum knockout von *Phd3* eine geringere Erhöhung der NF- κ B-vermittelten angeborenen Immunantwort vermutet werden, die zu einer reduzierten bzw. unzulänglichen T-Zellaktivierung führte. Zudem kann bei den Experimenten von Kiss et al. eine Kompensation des *Phd3*-knock-outs durch PHD1 oder PHD2 nicht ausgeschlossen werden [Kiss et al. 2012]. Ein weiterer möglicher Hinweis zur geminderten T-Zellaktivierung durch den PHD-Inhibitor brachte die CD3-Färbung, mit der die T-Zellinfiltration ins Nierengewebe nachge-

wiesen wurde. Durch die CD3-Färbung konnte eine geminderte renale T-Zellinfiltration nach CLP, LPS und PCI bei den PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen, im Vergleich mit den WT-Mäusen festgestellt werden. Es kann von einer reduzierten Aktivierung der T-Zellen nach Sepsis bei 3,4-DHB-Vorbehandlung ausgegangen werden. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass durch die CD3-Färbung alle T-Zellen erfasst wurden, ohne die Population zu differenzieren. Die T-Zellpopulation besteht aus den T-Helferzellen, den zytotoxischen T-Zellen, den regulatorischen T-Zelle (Suppressor T-Zellen), den T-Gedächtniszellen, den Natürlichen Killer T-Zellen (NKT) und den $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positiven T-Zellen, welche unterschiedliche Funktionen in der T-Zellsignalkaskade haben.

Eine nicht-adäquate Aktivierung der T-Zellen führt zur unvollständigen angeborenen Immunantwort und damit zur verringerten bakteriellen Abwehr und zu vermindertem Überleben [Georgiev et al. 2013, Kasten et al. 2010]. Die Daten dieser Arbeit lassen eine Übereinstimmung mit dieser These von Georgiev et al. und Kasten et al. zu.

5.1.5 Verbesserung der septischen AKI durch reduzierte $\text{TNF}\alpha$ -Expression in der Niere

In neueren Tierstudien konnte die Ursache für die lokale renale Hypoxie den Mediatoren der zellulären Schädigung zugeordnet werden und ist nicht wie lange angenommen auf eine reduzierte Durchblutung der Niere zurückzuführen [Klenzak und Himmelfarb 2005, Zarjou und Agarwal 2011, Frithiof 2012]. Es wurden in der vorliegenden Arbeit zwar keine Untersuchungen einer renalen Ischämie durchgeführt, allerdings wurde in beiden Mausgruppen nach CLP, LPS und PCI eine deutliche Erhöhung von $\text{TNF}\alpha$ in der Niere immunhistochemisch nachgewiesen. $\text{TNF}\alpha$ ist einer dieser zellulären Schädigungsmediatoren [Knotek et al. 2001]. Nach Sepsis konnte gezeigt werden, dass die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant niedrigere renale $\text{TNF}\alpha$ -Expression aufwiesen (Abb.18). In den renalen Genexpressionsdaten von *Tnf α* konnte der gleiche Effekt nach CLP und LPS gezeigt werden (Abb.17). Im PCI-Sepsismodell wurde nach 24 h eine sepsisbedingte Steigerung der Genexpression von *Tnf α* in beiden Mausgruppen festgestellt. Aufgrund der hohen Heterogenität wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Genexpression von *Tnf α* zwischen septischen WT- und PHD-Inhibitor-Mäusen gemessen (Abb.17). Eine funktionelle Rolle von $\text{TNF}\alpha$ in der Endotoxin-vermittelten AKI wurde durch verschiedene Studien gezeigt. In Kaninchen wurde durch intravenöse Infusion von $\text{TNF}\alpha$ ein AKI ausgelöst [van der Veen et al. 1999] und in der Rattenniere führte $\text{TNF}\alpha$ zur reduzierten glomerulären Filtrationsrate [Bertani et al. 1989]. Knotek et al. zeigten im Mausmodell durch TNF -Neutralisierung einen protektiven Effekt auf die renale Funktion [Knotek et al. 2001]. Die Zy-

tokin-induzierte AKI führt zur weiteren Freisetzung von Zytokinen, induziert eine Vasokonstriktion, die Aggregation von Neutrophilen sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies [Thijs und Thijs 1998, Klenzak und Himmelfarb 2005] und spielt damit im Tiermodell eine wichtige Rolle.

Die niedrigeren $\text{TNF}\alpha$ -Protein- und *Tnf* α -Genexpressionsniveaus in der Niere der Mäuse mit Inhibitor-Behandlung (mit Ausnahme der *Tnf* α -Genexpression nach PCI), sind aufgrund der bekannten Daten zu $\text{TNF}\alpha$ vermutlich verantwortlich für die geringeren morphologischen Schäden bzw. eine verzögerte Organdysfunktion in der Niere nach Sepsis.

5.1.6 Klinischer Status in Abhängigkeit der PHD-Inhibition nach Sepsis

Durch die Beurteilung des klinischen Schweregrades (CSS) konnte in allen Mausmodellen eine augenfällige Verschlechterung nach Sepsis bzw. Endotoxin-Injektion gezeigt werden (Abb. 23). Die Mäuse wiesen eine bei Sepsis typische Verminderung der spontanen Aktivität, Bewegungsarmut, Reaktionsverlust auf exogene Stimuli, Krämpfe und eine gekrümmte Körperhaltung aufgrund der Peritonitis auf [Gonnert et al. 2011]. Dies war vor allem bei den CLP- und PCI-Sepsisinduktionsmodellen deutlich erkennbar. Beide Modelle werden in der Sepsisforschung zur Entwicklung einer Peritonitis verwendet, welche eine humane Sepsis reproduziert. Die Mäuse mit LPS-Injektion zeigten nur leichte Sepsissymptome. Es ist bekannt, dass die Applikation von LPS nicht die Komplexität einer humanen Sepsis widerspiegelt, allerdings ist dieses Modell zur Beobachtung der Modulation der Zytokine sehr gut geeignet. Die sepsisbedingten Symptome der PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse waren im PCI-Modell stärker ausgeprägt und deuten daher auf einen schlechteren gesundheitlichen Zustand nach Sepsis durch die PHD-Inhibition hin.

Da der CSS ein sehr subjektiver Parameter ist, ergänzten Blutplasmauntersuchungen den klinischen Status der septischen Versuchstiere (Abb. 24). Eine durch Sepsis verursachte Organdysfunktion wurde durch verschiedene Marker im Blutplasma untersucht. Zur Analyse der sepsisbedingten Organschädigung wurde Bilirubin, LDH, AST und ALT im Blutplasma bestimmt, welche vor allem Erkrankungen der Leber und eine Hämolyse nachweisen. Die Leber spielt eine Schlüsselrolle bei der metabolischen und immunologischen Homöostase und führt bei einer krankheitsbedingten Funktionsänderung zur Entwicklung eines Multiorganversagens [Bauer et al. 2013]. Die beobachtete Leberdysfunktion bzw. globale zelluläre Schädigung nach Sepsis entsprach bei den WT-Mäusen den aus der Literatur bekannten Werten [Dahlke et al. 2011, Gonnert et al. 2011], wohingegen die LPS-behandelten Mäuse kaum Gewebeschäden aufwiesen. In keinem der Sepsis- bzw. Endotoxinmodelle konnte durch die Vorbehandlung mit dem PHD-Inhibitor eine Verbesserung des klinischen Status

nach Sepsisinduktion anhand der gemessenen Schädigungsmarker beobachtet werden. Im Gegenteil lässt sich eine systemische Verschlechterung aufgrund der gemessenen ALT-Werte nach CLP und PCI vermuten. Die Beeinträchtigung der renalen Funktion in den septischen Mäusen wurde bereits anhand der Anurie der Mäuse deutlich. Die Nierenretentionsmarker bestätigten diesen Funktionsverlust. Vor allem BUN war nach Sepsisinduktion wie auch nach Endotoxin-Gabe in beiden Mausmodellen erhöht (Abb. 25). Nach CLP war BUN in beiden Genotypen ähnlich stark erhöht. Im PCI-Modell war der Nierenfunktionsmarker BUN bei den PHD-Inhibitor-behandelten Mäusen im Gegensatz zu den WT-Mäusen signifikant höher. Dies deutet auf eine Verschlechterung der PCI-sepsisbedingten Nierenfunktion durch 3,4-DHB hin. Nach LPS wurde hingegen eine Verbesserung der Nierenfunktion anhand von BUN bei den Inhibitor-behandelten Mäusen beobachtet. Zwei weitere Plasmaparameter, Kreatinin und NGAL, die die Nierenfunktion kontrollieren, zeigten gleich starke Effekte wie der Nierenfunktionsmarker BUN auf. Nach CLP stiegen Kreatinin und NGAL auf etwa gleich hohe Niveaus, LPS führte zu einer tendenziellen Verbesserung und PCI zu einer tendenziellen Verschlechterung der Nierenfunktion der 3,4-DHB-behandelten Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abb. 25). Blutplasma-Kreatinin, als Nierenretentionsmarker, war lediglich nach CLP in beiden Mausmodellen signifikant erhöht. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass ein „normaler“ Kreatinin-Wert nichts über eine beginnende Niereninsuffizienz aussagt, da der Wert erst bei eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate (GFR, in den Versuchreihen nicht direkt gemessen) ansteigt [Perrone et al. 1992]. Da bei den scheinoperierten Mäusen ebenfalls eine leichte Erhöhung des Blutplasma-Kreatinins gemessen wurde, ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der eingeschränkten post-operativen Beweglichkeit und der damit verbundenen reduzierten Flüssigkeitsaufnahme (ohne Volumentherapie) die GFR bereits eingeschränkt war. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse im zweiten Teil der Arbeit zum „Einfluss des RAAS bei sepsisinduzierter AKI“ (Abb. 31). Die Mäuse erhielten 6 h nach CLP eine Volumentherapie, was kein Anstieg des Blutplasma-Kreatinins bei den septischen und nicht-septischen Mäusen zur Folge hatte. Eine weitere Bestätigung kommt aus der PAS-Reaktion (Abb. 20), wo auch die sham-operierten Mäuse ohne Volumentherapie eine milde tubuläre Schädigung aufwiesen. Es ist bekannt, dass proximale Tubuluszellen Kreatinin sezernieren und es bei einer Tubulusschädigung bzw. einer Inhibierung der Urinausscheidung zu erhöhten Blutplasma-Kreatinin-Spiegeln kommt [Sayer und Brown 2006, Ciarimboli et al. 2012]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in septischen Mäusen die Produktion von Kreatinin reduziert wird und einen entsprechend sepsisbedingten Anstieg abfedert, was Kreatinin als Marker für eine Nierenschädigung in Sepsis limitiert [Doi et al. 2009b]. Parameter, die die Funktionsstörung und Schädigung der Niere genauer analysieren, wurden mit der Messung des ACR und NGAL-CR bestimmt (Abb. 26). ACR misst die glomeruläre Proteinurie, insofern ein Schaden des Glomerulus vorliegt. Nach CLP-

Sepsisinduktion wurde in beiden Behandlungsgruppen eine gleich stark ausgeprägte Mikroalbuminurie (ACR = 30-300 mg/g) gemessen. Auch hier lässt sich ein Einfluss der Scheinoperation nicht ausschließen. Sowohl im LPS- als auch im PCI-Modell wurde eine Erhöhung des ACR und damit ein Glomerulusschaden in den WT-Mäusen detektiert. Die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse zeigten zwar eine leichte Erhöhung des ACR, allerdings ohne die Folgen einer Mikroalbuminurie (ACR > 30 mg/g) nach LPS und PCI. Diese Ergebnisse weisen auf eine verminderte glomeruläre Proteinurie und damit auf eine verminderte Nierenschädigung nach Sepsis durch den Einsatz des PHD-Inhibitors hin. NGAL ist vor allem bei der septischen AKI im Blutplasma (Abb. 25) und im Urin (Abb. 26) stärker erhöht und macht Gewebeschäden –primär tubuläre Schäden in der Niere – sichtbar [Bagshaw et al. 2009]. NGAL kann zudem aus extrarenalen Geweben oder bei entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. bei Sepsis, freigesetzt werden und dient damit nicht nur als Biomarker für AKI [Bruck 2009]. Die im Versuchsprotokoll gemessenen NGAL-Werte im Blutplasma und Urin zeigten zwar einen sehr deutlichen Anstieg und damit eine Gewebeschädigung an, allerdings keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der PHD-Inhibitor-Behandlung. Nach CLP-Sepsis schienen die PHD-Inhibitor-behandelten Mäuse aufgrund einer höheren NGAL-Kreatinin-Ratio stärkere Gewebeschädigung aufzuweisen. Es muss berücksichtigt werden, dass NGAL ein sehr früher Schädigungsmarker ist und bereits nach 2 h erhöht ist und relativ schnell wieder abfällt [Mishra et al. 2005, Mori et al. 2005, Bennett et al. 2008], weswegen eine Aussage zu fehlenden Veränderungen nach 24 h in diesem Fall schwierig ist. Auf den gesamten Organismus betrachtet hatte die PHD-Inhibitor-Behandlung bei den gemessenen klinischen Merkmalen einen negativen Effekt. Lediglich anhand der ACR im PCI-Modell und nach Endotoxin-Injektion wurde eine bessere Nierenfunktion im Vergleich zu den WT-Mäusen beobachtet.

5.1.7 Höhere Sterblichkeit im murinen Peritonitis-Modell trotz reduzierter renaler Schädigung nach PHD-Inhibitor-Behandlung

Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α durch den PHD-Inhibitor negative Auswirkungen auf den klinischen Status des Gesamtorganismus hatte und zu einer verminderten angeborenen Immunantwort führte. Diese verminderte angeborene Immunantwort reduzierte eine renale Dysfunktion und morphologische und apoptotische Schäden in der Niere nach Sepsis. Zur Überprüfung der PHD-Inhibitor-Wirkung wurde zusätzlich eine Überlebenskinetik durchgeführt. Eine Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α im Gesamtorganismus erwies sich nach Sepsis als nachteilig (Abb. 27). Es starben mehr PHD-Inhibitor-behandelte Mäuse nach Sepsis – ausgelöst durch CLP oder PCI – als WT-Mäuse. Dies ist kompatibel mit den Daten von Kiss et al., die bei den

Phd1^{-/-}, *Phd2*^{-/-} und vor allem den *Phd3*^{-/-} knockout-Mäusen ebenfalls ein gesteigerte Letalität zeigten. Sie zeigten eine erhöhte HIF-1 α -Proteinstabilisierung. Allerdings ließen die Daten von Kiss et al., vermuten, dass die HIF-1 α Stabilisierung zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität führte und damit zur gesteigerten angeborenen Immunantwort [Kiss et al. 2012]. In den Experimenten dieser Arbeit konnte eine gesteigerte Immunantwort nicht gezeigt werden. Im Gegenteil scheint aufgrund der weniger stark exprimierten proinflammatorischen Zytokine eine unzulängliche angeborene Immunantwort Ursache der erhöhten Letalität zu sein. Der Einsatz des PHD-Inhibitor führte zu reduzierten renalen Schäden, muss aber aufgrund der systemischen Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α in anderen Organen oder in der Signaltransduktion des Stoffwechsels erhebliche Auswirkungen gehabt haben. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass MORG1 und die PHD's in anderen Organen bzw. in der Signaltransduktion eine für das Überleben übergeordnete Rolle spielen. MORG1 (mitogen-activated protein kinase **organizer** 1) ist als Bindungspartner des ERK-(*extracellular signal-regulated Kinase*)-Scaffoldproteins MP1 in verschiedenen Komponenten des ERK-Signalwegs involviert [Vomastek et al. 2004]. Zu diesen gehören MP1, Raf-1, MEK und ERK/MAPK, welche durch MORG1 in einem oligomeren Komplex stabilisiert werden. MAPK und ERK gehören zu evolutionär konservierten Signalwegen, welche in vielen fundamentalen zellulären Prozessen Einfluss nehmen. Zu diesen gehören Zellproliferation, Überleben, Differenzierung, Apoptose, Zellmotilität und der Metabolismus [Kolch 2005]. Die PHD's sind aufgrund ihrer Sauerstoff wahrnehmenden Eigenschaft in verschiedenen HIF-Signalweg-abhängigen Prozessen, wie z.B. Angiogenese, Erythropiesis, Apoptose, Zellproliferation, Überleben, Glukosemetabolismus, pH-Regulation und Proteolyse eingebunden. Es wurde aber auch gezeigt, dass die PHD's wegen ihrer Aktivierbarkeit durch 2-Oxoglutarat eine Art „Pseudo-Hypoxie“ auslösen können und damit eine zentrale Rolle bei verschiedenen metabolischen Prozessen spielen [Selak et al. 2005]. Es wird sogar eine funktionelle Verbindung zwischen PHD's und mTOR diskutiert, welches unter anderen für die HIF-Transkription verantwortlich ist und entsprechende o.g. Prozesse beeinflussen kann [Boulahbel et al. 2009].

5.2 Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System bei sepsisinduzierter Nierenschädigung

In diesem Teil der experimentellen Reihe wurde der Einfluss der prä-septischen Verabreichung von ANG II und den Angiotensinogen-Converting-Enzym-Inhibitor Ramipril auf die Nierenschädigung nach Sepsis untersucht. Im Besonderen sollte dabei analysiert werden, ob diese Beeinflussung einen Unterschied im Grad der Nierenschädigung zwischen den WT- und den HZ-Mäusen zeigte. Dabei wurde sich auf eines der Sepsismodelle bezogen. Das zur humanen Sepsis klinisch relevantere Modell ist CLP und wurde dem PCI- und dem En-

dotoxin-Modell vorgezogen. Das Endotoxin LPS-Modell ist zwar eine einfache Methode, um einen guten Einblick in inflammatorische Prozesse zu erhalten. Allerdings ist dies keine adäquate Methode, um die Komplexität der humanen Bedingungen einer Sepsis zu reproduzieren [Remick und Ward 2005]. In anderen Arbeiten konnte zwar eine vergleichbare Mortalität im LPS- und CLP-Mausmodell demonstriert werden, allerdings mit signifikanten Unterschieden in Kinetik und im Ausmaß der Zytokinproduktion [Remick et al. 2000]. Das PCI-Modell, welches wie CLP eine septische Peritonitis verursacht, hat aufgrund des reduzierten Einflusses der Scheinoperation in dieser Arbeit nicht die erhoffte verminderte Heterogenität aufgezeigt. Daher wurde mit dem klinisch relevanteren Modell der CLP weitergearbeitet. Es wurde kein Urin im Stoffwechselkäfig, sondern nur Spontanurin 24 h nach CLP gewonnen. Grund dafür ist die bereits durch Holly et al. beobachtete Anurie der septischen Mäuse und der zusätzlich negative Einfluss einer Unterkühlung in diesen Käfigen [Holly et al. 2006]. Für die Experimente dieser Untersuchung wurden insgesamt zwölf Behandlungsgruppen analysiert. Zwei WT- und zwei HZ-Mausgruppen, die jeweils eine Scheinoperation bzw. CLP erhielten sowie die gleichen Gruppen mit vorheriger ANG II- bzw. Ramipril-Infusion.

5.2.1 Klinischer Status in Abhängigkeit des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System nach Sepsis

Die Sepsisinduktion verursachte in allen Untersuchungsgruppen eine signifikante Verschlechterung ihres äußeren Erscheinungsbildes, gemessen an den klinischen Merkmalen des CSS, wie verminderte spontane Aktivität, reduzierte Reaktion auf exogene Stimuli und eine gekrümmte Haltung (Abb. 28). Diese entsprechen den bei Sepsis typischen Bewertungsmerkmalen [Gonnert et al. 2011]. Die ANG II-Infusion verursachte bei den septischen WT-Mäusen, aber nicht bei den septischen HZ-Mäusen eine Verschlechterung im äußeren Erscheinungsbild. Die Ramipril-Behandlung hatte den stärksten negativen Einfluss nach CLP, sowohl bei den WT- als auch bei den HZ-Mäusen, wobei auch hier die HZ-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen eine geringere Belastung aufwiesen. Im akuten klinischen Erscheinungsbild zeigte sich die Ramipril-Behandlung bei Sepsis als nachteilig. Diese Beobachtungen des CSS wurden durch die Analysen der Gewebeschädigungsmarker Bilirubin- und LDH-Blutplasmawerten (Abb. 30) bestätigt. Die septischen WT- und HZ-Mäuse wiesen mit Ramipril schwerere Gewebeschädigung nach Sepsis im Vergleich zu den septischen Mäusen mit ANG II-Behandlung bzw. ohne Behandlung auf. Durch die Ramipril-Infusion konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Eine leichte Erhöhung des LDH-Wertes wurde auch bei den septischen WT-Mäusen mit ANG II detektiert. Die Analyse der Nierenfunktion durch Blutplasma-Kreatinin, -BUN und -NGAL (Abb. 31) zeigte eine signifikante Verschlechterung nach Sepsis bei zusätzlicher Ra-

mipril-Behandlung bei den WT- und HZ-Mäusen. Wobei die HZ-Mäuse mit Ramipril eine geringere Nierenschädigung im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen mit Ramipril zeigten. Die Behandlung beider Mausgenotypen mit ANG II brachte nach Sepsis keine Verbesserung bzw. Verschlechterung der Nierenfunktion im Vergleich zu den septischen unbehandelten Kontrollen. Die verschlechterte Nierenfunktion durch Ramipril wurde auch anhand der Anurie der septischen Mäuse deutlich. Daher war es schwer, mit Hilfe des ACR einen Vergleich der glomerulären Funktion der Niere zwischen den Mausgruppen herzustellen, da bei den septischen Ramipril-injizierten WT-Mäusen lediglich von einer Maus und bei den HZ-Mäusen von drei Mäusen Urin entnommen werden konnte. Es ist bekannt, dass vor allem bei chronischer ACE-Inhibition das Risiko einer Nephropathie und renaler Insuffizienz gegeben ist [Cirit et al. 2006]. Außerdem kann Ramipril allein bereits zu Stoffwechselstörungen und Lebererkrankungen, die mit erhöhten BUN-, Kreatinin-, Bilirubin oder Leberenzymwerten einher gehen, führen [Fachinformation Ramipril]. Bei den scheinoperierten Ramipril-behandelten Mäusen wurde dies zwar nicht beobachtet, könnte aber die stärkere Erhöhung dieser Werte aufgrund der Hypotonie nach Sepsis erklären.

Ramipril verursachte eine Verschlechterung des klinischen Status nach Sepsis, wobei die HZ-Mäuse durch die Behandlung eine signifikant geringere Nierenschädigung verglichen mit den WT-Mäusen aufwiesen. ANG II hatte in beiden Genotypen nach Sepsisinduktion, mit Ausnahme eines erhöhten LDH-Wertes bei den septischen ANG II-WT-Mäusen, keine Auswirkung auf die gemessenen klinischen Parameter im Gegensatz zu den septischen WT- und HZ-Mäusen. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich den Blutdruck der Versuchstiere im Verlauf der Ramipril- bzw. ANG II-Behandlung mit konsekutiver Sepsis zu beobachten. Dies ist eine methodische Limitation dieser Arbeit, da keine Daten zum Einfluss des Blutdruckes nach Sepsis erhoben werden konnten.

Die Messungen des kleinen Blutbildes bei den WT-Mäusen nach Sepsisinduktion (Abb. 29) entsprechen denen aus der Literatur bekannten Werten. Wie bei Gonnert et al. zeigte sich nach Sepsisinduktion eine signifikant verringerte weiße Blutkörperchen- und Plättchen-Zahl sowie ein reduzierter Hämatokritwert [Gonnert et al. 2011]. Der Hämatokrit misst die zellulären Bestandteile des Blutes, welches hauptsächlich die Konzentration der Erythrozyten (99 %) bestimmt und damit auch ein Maß des Hämoglobingehaltes ist. Der reduzierte Hämatokrit, Erythrozytenwert und Hämoglobingehalt in den septischen WT-Mäusen war ein Hinweis für eine Anämie durch Sepsis. Die HZ-Mäuse wiesen in allen im kleinen Blutbild gemessenen Parametern niedrigere Werte nach Scheinoperation auf, welche dann nach Sepsis weniger stark reduziert waren, im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen. ANG II führte bei den septischen WT-Mäusen nicht zur Abnahme des Hämatokrit, der Erythrozyten und des Hämoglobingehaltes – Indizien für eine verminderte sepsisbedingte Anämie. Durch Ramipril wurde bei den Mäusen beider Genotypen ein deutlich erhöhter Hämatokrit, Erythrozy-

tenwert und Hämoglobingehalt nach Sepsis gemessen. Ursache könnte eine durch Ramipril verursachte Hypotonie nach Sepsis sein, welches zum verminderten Blutvolumen bzw. einer Dehydratation führt und damit die prozentuale Erytrozytenzahl erhöhte. Eine Anämie bei Ramipril-Behandlung nach Sepsis war daher nicht nachweisbar.

5.2.2 Einfluss des Renin-Aldosteron-Angiotensin-System auf die renale HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression

In den scheinooperierten HZ-Mäusen wurde, verglichen zu den WT-Kontrollen, eine um die Hälfte reduzierte *Morg1*-Genexpression (Abb. 37), allerdings ohne Reduktion von MORG1 auf Proteinebene (Abb. 38), nachgewiesen. Zu vermuten ist, dass ein Allel ausreichend ist, um die Proteinexpression des fehlenden Allels zu kompensieren. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Scheinoperation eine Auswirkung auf das MORG1-Proteinniveau der HZ-Mäuse in der Niere hatte (Daten nicht gezeigt). Auf der mRNS- und Proteinebene von *Phd3*/PHD3 (Abb. 37 und 38) konnte in Abhängigkeit des Genotypes keine signifikante Änderung beobachtet werden. In den HZ-Kontrollen konnte aber eine tendenziell erhöhte HIF-1 α - und signifikant höhere HIF-2 α -Proteinexpression in der Niere (Abb. 36) festgestellt werden. Dies entsprach den durch Hammerschmidt et al. gezeigten Daten, die im AKI-Modell durch Ischämie/Reperfusion bei den HZ-Mäusen stabilisiertes HIF-1 α und HIF-2 α nachweisen konnten [Hammerschmidt et al. 2009]. Die signifikant gesteigerte HIF-2 α -Expression führte vermutlich im Rahmen des Feedbackloops zur reduzierten mRNS-Expression des eigenen Gens (Abb. 35). Erhöhtes HIF-1 α und HIF-2 α in HZ-Kontrollen hatte auf die mRNS-Expression der gemessenen Zielgene *Glut1*, *Epo* und *Vegf* in der Niere (Abb. 39) sowie auf Plasmakonzentration von EPO und VEGF keinen Einfluss (Abb. 40). Die Plasmakonzentration von VEGF bei den WT-Kontrollen lag, verglichen mit den anderen Kontrollgruppen, relativ hoch. Der Grund hierfür konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist bekannt, dass ANG II in Nierenzellen zu Expression von HIF-1 α führt [Wolf 2005]. Dies konnte immunhistochemisch in den Kontrollmäusen beider Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 36). ANG II beeinflusste nicht die Proteinexpression von HIF-2 α in der Niere der WT- und HZ-Kontrollen. Im Gegensatz dazu führte Ramipril zu keiner Änderung von HIF-1 α in den Kontrollen (Abb. 36), aber zur basalen Erhöhung von HIF-2 α und reduzierter *Hif-2 α* -mRNS in den WT-Kontrollen (Abb. 35).

5.2.3 Reduzierte renale Gewebedilatation und Apoptose nach Sepsis durch den Einfluss auf das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System

Untersuchungen der renalen Gewebestrukturen mit Hilfe der PAS-Reaktion zeigten in der WT-Niere sepsistypische Veränderung des renalen Gewebes – Vakuolisierung und Dilatation der proximalen Tubuluszellen, wie sie schon durch Doi et al. beschrieben wurden [Doi et al. 2009a]. Im Nierengewebe der HZ-Mäuse wurden signifikant geringere Schäden beobachtet. Eine reduzierte Schädigung des Nierengewebes bei den septischen HZ-Mäusen im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen, lässt sich auf die basal gesteigerte HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression in den Nieren der HZ-Mäuse (Abb. 36) zurückführen. Wie schon in den Untersuchungen mit dem PHD-Inhibitor in dieser Arbeit, konnte eine geminderte Nierenschädigung aufgrund erhöhter renaler HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression vor der Sepsisinduktion nachgewiesen werden. Vor allem HIF-2 α war signifikant erhöht, was eine größere Bedeutung bei der septischen AKI, im Vergleich zu HIF-1 α , vermuten lässt. Durch die Behandlung der Mäuse mit ANG II und Ramipril konnte bei den WT-Mäusen eine Verbesserung der sepsisbedingten Nierenschädigung im Vergleich zu den unbehandelten septischen WT-Mäusen erzielt werden. Bereits 1985 wiesen Schaller et al. eine Aktivierung des RAAS bei schwerer Sepsis nach [Schaller et al. 1985]. Es konnte gezeigt werden, dass ANG II bei Sepsis im Blutplasma stark anstieg, um die septische Hypotonie zu mindern [Schaller et al. 1985, Doerschug et al. 2010]. Es ist bekannt, dass eine ANG II-Influsion der septischen Hypotonie entgegen wirkt, was allerdings zur renalen Vasokonstriktion führen kann [May et al. 2012]. May et al. zeigten, dass besonders in der frühen Phase der Sepsis ANG II ein nützlicher Vasokonstriktor ist, der in dieser Phase noch nicht zur Minderung der renalen Funktion führte. Eine zeitliche Verschiebung der renalen morphologischen Änderungen würde das verbesserte Bild des Nierengewebes bei den septischen ANG II-behandelten WT-Mäusen erklären. Die zusätzliche ANG II-Gabe scheint allerdings nur bei der sehr frühen sepsisbedingten Nierenschädigung vorteilhaft zu sein, denn ANG II korreliert mit dem Ausmaß der Organschädigungen in den ersten Tagen nach Sepsis [Doerschug et al. 2010]. Studien, die z.B. den Einfluss des ACE-Hemmers Enapril [Hagiwara et al. 2009a] oder der AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan [Hagiwara et al. 2009b] und Candesartan [Laesser et al. 2004] untersuchten, wiesen nach diesen Behandlungen eine geminderte ANG II-Konzentration im Blutplasma nach LPS auf. Dies reduzierte die LPS-induzierte Inflammation, schützte vor akuten Lungenschäden und wies eine erhöhte Überlebensrate auf. Dieser Effekt wurde auch im CLP-Sepsismodell bei Ratten beobachtet. Ein (Pro)Renin-Rezeptor-Blocker führte zu einer erhöhten Überlebensrate. Dies ist wahrscheinlich auf eine Abmilderung der sepsisinduzierten systemischen Inflammation zurückzuführen, denn es wurde eine reduzierte TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und HMGB1-Blutplasmaexpression gemessen [Hirano et al. 2013]. In den Experimen-

ten dieser Arbeit wurde bereits eine leichte Nierengewebeschädigung durch alleinige Ramipril-Behandlung nach Scheinoperation beobachtet. Ursache könnten die Nebenwirkungen des Ramipril sein – z.B. Stoffwechselstörungen, Gefäßerkrankungen, Erkrankungen der Nieren und Harnwege und Lebererkrankung [Fachinformation Ramipril]. ANG II und Ramipril hatte auf das Ausmaß der septischen Nierenschädigung bei den HZ-Mäusen keinen Einfluss. Eine basale Stabilisierung von HIF-1 α und vor allem HIF-2 α im Nierengewebe, wie es bei den unbehandelten HZ-Kontrollen im Vergleich zu den WT-Kontrollen beobachtet wurde, war nach ANG II- und Ramipril-Behandlung nicht erkennbar.

Durch aktive Caspase 3-Färbung konnte bei den septischen WT-Mäusen renale Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 34). Wie schon im ersten Teil dieser Arbeit zu dem PHD-Inhibitor führte vermutlich die Stabilisierung der HIF-1 α und HIF-2 α -Expression auch bei den HZ-Mäusen zu einer verminderten renalen Apoptose verglichen mit den WT-Mäusen nach Sepsis. Hammerschmidt et al. wiesen ebenfalls eine reduzierte renale Apoptose bei den HZ-Mäusen im AKI-Modell nach Ischämie/Reperfusion nach [Hammerschmidt et al. 2009]. ANG II reduzierte die renale Apoptose geringfügig bei den septischen HZ-Mäusen, im Vergleich zu den unbehandelten septischen HZ-Mäusen. Wohingegen die septischen WT-Mäuse mit ANG II keine apoptotischen Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten septischen WT-Mäusen aufwiesen. Die bekannte ANG II-abhängige Organschädigung bei Sepsis [Doerschug et al. 2010], würde eine erhöhte renale Apoptose bei den Mäusen mit zusätzlicher ANG II-Freisetzung über die osmotischen Pumpen vermuten lassen. Dies konnte hier 24 h nach Sepsisinduktion nicht gezeigt werden, wobei die positive Auswirkung von ANG II als Vasokonstriktor in der frühen Phase der Sepsis eine zeitliche Verschiebung der ANG II-abhängigen Organschädigung verursacht haben könnte [May et al. 2012]. Eine weitere Erklärung könnte in der ANG II-abhängigen HIF-1 α -Expression in renalen Zellen liegen [Wolf 2005], welches wiederum eine Nierenschädigung zeitlich verschoben haben könnte. Für eine Bestätigung dieser These wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine weiteren Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten durchgeführt. In den Nieren der ANG II-behandelten Mäusen beider Genotypen konnte eine Erhöhung der HIF-1 α -Expression beobachtet werden. Diese HIF-1 α -Expression könnte der ANG II-abhängige Nierenschädigung bei Sepsis entgegen gewirkt haben. Durch die Behandlung der WT-Mäuse mit Ramipril konnte die Apoptose im Nierengewebe auf das Niveau der scheinoperierten-Kontrollen reduziert werden. Die HZ-Mäuse wiesen nur eine leichte Erhöhung der renale Apoptose nach Sepsisinduktion auf. Eine geminderte ANG II-Freisetzung durch Ramipril erklärt, wie in o.g. vergleichbaren Studien [Hagiwara et al. 2009b, Hagiwara et al. 2009a, Hirano et al. 2013, Laesser et al. 2004], die reduzierte Organschädigung.

5.2.4 Verbesserung der septischen AKI durch reduzierte renale Inflammation und T-Zellinfiltration bei allen HZ-Mäusen und WT-Mäusen mit Ramipril-Behandlung

TNF α ist als zellulärer Schädigungsmarker nach Sepsisinduktion erhöht [Knotek et al. 2001]. Dies konnte 24 h nach CLP bei den WT-Mäusen auf Protein- und mRNA-Ebene in der Niere gezeigt werden (Abb. 41 und 42). Die septischen HZ-Mäuse wiesen im Gegensatz zu den septischen WT-Mäusen eine reduzierte mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine *Tnf α* und *Il-1 β* sowie eine geringere TNF α -Proteinexpression im Nierengewebe auf. Entsprechend den Versuchen zur PHD-Blockierung, lässt die gemessene basale renale HIF-1 α - und HIF-2 α -Expressionserhöhung der HZ-Mäuse den Schluss zu, dass eine reduzierte renale Inflammation nach Sepsis erfolgte. Diese These wurde durch die verminderte T-Zellinfiltration im Nierengewebe der HZ-Mäuse im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen gestützt (Abb. 43). ANG II führte in den septischen WT-Mäusen zur stärkeren Expression der Gene von *Tnf α* und *Il-1 β* und des TNF α -Proteins sowie zu einer hohen T-Zellinfiltration. In Abhängigkeit zu den in anderen Arbeiten beobachteten Organschädigungen durch ANG II bei Sepsis [Doerschug et al. 2010] wäre eine Erhöhung zellulärer Schädigungsmediatoren wie TNF α folgerichtig. Vergleichbar mit den unbehandelten HZ-Mäusen führte ANG II bei den HZ-Mäusen nach Sepsis zu einer signifikant reduzierten *Tnf α* - und *Il-1 β* -Genexpression sowie zu einer niedrigeren TNF α -Proteinexpression im Verhältnis zu den septischen WT-Mäusen mit ANG II. Es wurde ebenfalls eine verringerte apoptotische Nierenschädigung beobachtet. ANG II ist in verschiedenen Prozessen der Inflammation involviert. Zum einen reguliert ANG II die inflammatorische Zellantwort, in dem es die Immunzellen über den ANG II-Typ 1-Rezeptor aktiviert und als Chemotaxisfaktor mononukleäre Zellen, Neutrophile sowie T- und B-Lymphozyten anzieht sowie die Makrophagenphagozytose stimuliert [Ruiz-Ortega et al. 2001]. Die Hochregulation der Chemokine wie z.B. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Interleukin-8, Interferon γ Inducible Protein-10 und RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) führt zur inflammatorischen Zellinfiltration. Auf der anderen Seite produzieren inflammatorische Zellen ANG II, was zur Progression von Gewebeschäden führen kann [Ruiz-Ortega et al. 2001]. Durch die Behandlung mit Ramipril wurde eine signifikant niedrigere renale *Tnf α* -Genexpression bei den septischen Mäusen beider Genotypen, im Vergleich zu den unbehandelten und ANG II-behandelten Mäusen, bestimmt. Ein niedriges TNF α -Proteinniveau und sehr geringe renale T-Zellinfiltration bei den Ramipril-behandelten Mäusen - unabhängig vom Genotyp - weisen auf eine verminderte renale Inflammation hin. Diese geminderte Inflammation hatte eine protektive Wirkung auf die septische AKI. Eine protektiven Wirkung bei septischen Organschädigungen durch ACE-Hemmer bzw. AT $_1$ -Rezeptor-Antagonisten aufgrund reduzierter Inflammation konnte bereits in diversen Studien gezeigt werden [Hagiwara et al. 2009b, Hagiwara et al. 2009a, Hirano et al. 2013, Laesser et al. 2004].

6. Schlussfolgerung und Ausblicke

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des PHD-Inhibitors 3,4-DHB und des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems in sepsisinduzierter Nierenschädigung untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Auswirkung auf die Niere bei einer geminderten PHD-Aktivität nach Sepsis analysiert werden. Überlebensstudien zeigten deutlich in den zwei verwendeten Sepsismodellen (CLP und PCI), dass eine basal geminderte HIF- α -Degradation für den Gesamtorganismus nachteilig war. Im Zeitraum dieser Analysen wurde 2012 durch Kiss et al., die mit *Phd3*^{-/-}-Mäusen Überlebensstudien durchführten, kompatible Ergebnisse veröffentlicht [Kiss et al. 2012].

Die Hemmung der PHD-Aktivität bewirkte keine Verbesserung der gemessenen klinischen Parameter. Allerdings wurden bei den PHD-Inhibitor-behandelten als auch den HZ-Mäusen nachweisbar geringere pathologische Schädigungen der Niere festgestellt. Beide Mausgruppen zeigten zudem eine geringere T-Zellinfiltration und Apoptose im Nierengewebe. Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der reduzierten Immunantwort. Die PHD-Inhibierung führte zur verminderten Inflammation. Weiterführende Studien mit Nierenzellen in Abhängigkeit einer geminderten PHD-Aktivität würden Aufschluss über diesen Mechanismus geben. Eine nierenspezifische PHD-Blockierung bzw. MORF1-Reduktion wäre ein weiterer Schritt zur Untersuchung einer protektiven Wirkung, die dem Gesamtorganismus zuträglich sein könnte. Denn der „pseudo“-hypoxische systemische Grundzustand, der durch die verminderte HIF- α -Degradation ausgelöst wurde, hatte eine negative Wirkung auf den Gesamtorganismus. Die Untersuchung anderer Organe, die bei sepsisbedingter Organdysfunktion betroffen sind, könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit gefunden widersprüchlichen Ergebnisse bringen.

Die Analysen zum Einfluss des RAAS bei sepsisinduziertem Nierenversagen durch ANG II bzw. Ramipril, zeigten keine Verbesserungen bei den gemessenen klinischen Parametern auf. Ramipril verursachte sogar eine deutlich Verschlechterung innerhalb der ersten 24 h nach Sepsisinduktion, verglichen zu den unbehandelten septischen Kontrollen. Es konnte kein Unterschied innerhalb der Behandlungsgruppen zwischen den WT- und HZ-Mäusen festgestellt werden. Allerdings konnte eine vorherige Behandlung der Mäuse mit ANG II und vor allem mit Ramipril eine verminderte pathologische Schädigung, Inflammation, T-Zellinfiltration und Apoptose im Nierengewebe nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die unbehandelten septischen HZ-Mäuse eine geringere Schädigung der Niere im Vergleich zu den septischen WT-Mäusen zeigte. Dies war nach ANG II- und Ramipril-Behandlung nur tendenziell zu beobachten. Auch hier stellt sich die Frage ob der Einfluss des RAAS auch auf

andere Organe des Organismus eine wichtige Rolle nach Sepsis spielt, daher wurden Lunge, Leber, Milz und Herz für weitere Untersuchung entnommen. Die Analyse dieser könnte einen tieferen Einblick über die Funktion des RAAS bei Sepsis geben. Leider konnten aus technischen Gründen keine Blutdruckwerte ermittelt werden, so dass letztendlich systemische hämodynamische Einflüsse der Manipulationen des RAAS nicht ausgeschlossen werden können.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Beeinflussung des HIF-Signalweges durch PHD's oder MORG1 sowie der Einfluss auf das RAAS auch bei Sepsis eine Verbesserung der septischen Nierenschädigungen bewirkt. Allerdings wurde nachgewiesen, dass dieser Einfluss auf die Niere konzentriert ist, da es auf den Gesamtorganismus einen gegenteiligen Effekt hatte. Dafür sind weiterführende Experimente und Analyse auf nierenspezifischer Ebene erforderlich. Eine Ausweitung der Untersuchungen auf den ERK-Signalweg, könnte zusätzlich Erkenntnisse zur äußerst komplexen Funktion von MORG1 bringen.

7. Literaturverzeichnis

- ACCP/SCCM. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20:864-874.
- Ahlstrom A, Tallgren M, Peltonen S, Pettila V. 2004. Evolution and predictive power of serum cystatin C in acute renal failure. *Clin Nephrol*, 62 (5):344-350.
- Ambühl PM. März 2001. Ursachen und Pathogenese des akuten Nierenversagens. *CURRICULUM Schweiz Med Forum*, Nr. 10 7:227-231.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. 2004. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279 (37):38458-38465.
- Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. 2004. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*, 92 (3):491-501.
- Aros C, Remuzzi G. 2002. The renin-angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *Journal of Hypertension*, 20:S45-S53.
- Asaduzzaman M, Lavasani S, Rahman M, Zhang S, Braun OO, Jeppsson B, Thorlacius H. 2009. Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Crit Care Med*, 37 (4):1389-1396.
- Bagshaw SM, George C, Bellomo R. 2008. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care*, 12 (2):R47.
- Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, Haase-Fielitz A, Egi M, Morimatsu H, D'Amico G, Goldsmith D, Devarajan P, Bellomo R. 2009. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med*, 36 (3):452-461.
- Bauer M, Press AT, Trauner M. 2013. The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Current Opinion in Critical Care*, 19 (2):123-127.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*, 55 (8):835-845.
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. 2004. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*, 8 (4):R204-212.
- Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, Syed H, Ali S, Barasch J, Devarajan P. 2008. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 (3):665-673.
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J*, 22 (16):4082-4090.
- Bertani T, Abbate M, Zoja C, Corna D, Perico N, Ghezzi P, Remuzzi G. 1989. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am J Pathol*, 134 (2):419-430.
- Boulahbel H, Duran RV, Gottlieb E. 2009. Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism. *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 1):291-294.
- Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. 1996. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med*, 24 (2):192-198.
- Bruck H. 2009. „neutrophil gelatinase-associated lipocalin“ (NGAL). *Nephrologe* © Springer Medizin Verlag, 4:152–153.
- Bruick RK, McKnight SL. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294 (5545):1337-1340.
- Carey RM, Siragy HM. 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 24 (3):261-271.

- Ciarimboli G, Lancaster CS, Schlatter E, Franke RM, Sprowl JA, Pavenstadt H, Massmann V, Guckel D, Mathijssen RH, Yang W, Pui CH, Relling MV, Herrmann E, Sparreboom A. 2012. Proximal tubular secretion of creatinine by organic cation transporter OCT2 in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 18 (4):1101-1108.
- Cirit M, Toprak O, Yesil M, Bayata S, Postaci N, Pupim L, Esi E. 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitors as a risk factor for contrast-induced nephropathy. *Nephron Clin Pract*, 104 (1):c20-27.
- CSCC Center for Sepsis Control and Care. 2013. Was ist Sepsis. URL: <http://www.cscck.uniklinikum-jena.de/Sepsis.html> (Stand: 05.08.2013)
- Dahlke K, Wrann CD, Sommerfeld O, Sossdorf M, Recknagel P, Sachse S, Winter SW, Klos A, Stahl GL, Ma YX, Claus RA, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. 2011. Distinct different contributions of the alternative and classical complement activation pathway for the innate host response during sepsis. *J Immunol*, 186 (5):3066-3075.
- Dear JW, Kobayashi H, Jo SK, Holly MK, Hu X, Yuen PS, Brechbiel MW, Star RA. 2005. Dendrimer-enhanced MRI as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-induced acute renal failure in aged mice. *Kidney Int*, 67 (6):2159-2167.
- Demidenko ZN, Blagosklonny MV. 2011. The purpose of the HIF-1/PHD feedback loop: to limit mTOR-induced HIF-1 α . *Cell Cycle*, 10 (10):1557-1562.
- Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. 2007. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, 26 (22):3185-3202.
- Doerschug KC, Delsing AS, Schmidt GA, Ashare A. 2010. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Crit Care*, 14 (1):R24.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. 2009a. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*, 119 (10):2868-2878.
- Doi K, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, Star RA. 2009b. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol*, 20 (6):1217-1221.
- DSG e.V. Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (9):4273-4278.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107 (1):43-54.
- Fachinformation Ramipril 2013. URL: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/19/11-25119.pdf> (Stand: 04.12.2013)
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, 63 (1):51-60.
- Fong GH, Takeda K. 2008. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*, 15 (4):635-641.
- Frithiof R. 2012. Sepsis-induced acute kidney injury-is there a lack of energy? *Intensive Care Med*, 38 (5):735-737.
- Georgiev P, Belikoff BG, Hatfield S, Ohta A, Sitkovsky MV, Lukashev D. 2013. Genetic deletion of the HIF-1 α isoform I.1 in T cells enhances antibacterial immunity and improves survival in a murine peritonitis model. *Eur J Immunol*, 43 (3):655-666.

- Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. 2008. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF α and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (12):4745-4750.
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242 (4884):1412-1415.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*, 7 (3):205-213.
- Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN. 2004. Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol*, 15 (12):3093-3102.
- Haase D, Keiner S, Mawrin C, Wolf G. 2009. Reduced Morg1 expression in ischemic human brain. *Neurosci Lett*, 455 (1):46-50.
- Hagel S. BF. 2011. Sepsis. Springer-Verlag, 48:57-73.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Matumoto S, Hidaka S, Noguchi T. 2009a. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in in vivo and in vitro models. *Crit Care Med*, 37 (2):626-633.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T. 2009b. Antagonist of the type-1 ANG II receptor prevents against LPS-induced septic shock in rats. *Intensive Care Med*, 35 (8):1471-1478.
- Hammerschmidt E, Loeffler I, Wolf G. 2009. Morg1 heterozygous mice are protected from acute renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297 (5):F1273-1287.
- Han M, Li Y, Liu M, Cong B. 2012. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol*, 13:25.
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. 2002. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*, 62 (1):237-244.
- Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. 1991. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol*, 9:745-772.
- Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragones J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH. 2008. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 19 (1):39-46.
- Hirano Y, Takeuchi H, Suda K, Hagiwara T, Miyasho T, Kawamura Y, Yamada S, Oyama T, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Ichihara A, Kitagawa Y. 2013. (Pro)renin receptor blocker improves survival of rats with sepsis. *J Surg Res*.
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, 272 (13):8581-8593.
- Hollenberg NK. 2004. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int*, 66 (1):1-9.
- Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. 2006. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*, 70 (3):496-506.
- Hopfer U, Hopfer H, Jablonski K, Stahl RA, Wolf G. 2006. The novel WD-repeat protein Morg1 acts as a molecular scaffold for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3 (PHD3). *J Biol Chem*, 281 (13):8645-8655.
- Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, Kellum JA. 2006. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*, 10 (3):R73.

- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock*, 24 Suppl 1:52-57.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292 (5516):464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292 (5516):468-472.
- Kasiganesan H, Sridharan V, Wright G. 2007. Prolyl hydroxylase inhibitor treatment confers whole-animal hypoxia tolerance. *Acta Physiol (Oxf)*, 190 (2):163-169.
- Kasten KR, Tschoep J, Goetzman HS, England LG, Dattilo JR, Cave CM, Seitz AP, Hildeman DA, Caldwell CC. 2010. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock*, 34 (4):377-383.
- Kaufman BS, Rackow EC, Falk JL. 1984. The relationship between oxygen delivery and consumption during fluid resuscitation of hypovolemic and septic shock. *Chest*, 85 (3):336-340.
- Ke Q, Costa M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70 (5):1469-1480.
- Kellum JA. 2008. Acute kidney injury. *Crit Care Med*, 36 (4 Suppl):S141-145.
- Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. 2008. Definition and classification of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 109 (4):c182-187.
- Kiss J, Mollenhauer M, Walmsley SR, Kirchberg J, Radhakrishnan P, Niemietz T, Dudda J, Steinert G, Whyte MK, Carmeliet P, Mazzone M, Weitz J, Schneider M. 2012. Loss of the Oxygen Sensor PHD3 Enhances the Innate Immune Response to Abdominal Sepsis. *J Immunol*, 189 (4):1955-1965.
- Klenzak J, Himmelfarb J. 2005. Sepsis and the kidney. *Crit Care Clin*, 21 (2):211-222.
- Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, Sirio CA, Murphy DJ, Lotring T, Damiano A, et al. 1991. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest*, 100 (6):1619-1636.
- Knotek M, Rogachev B, Wang W, Ecder T, Melnikov V, Gengaro PE, Esson M, Edelstein CL, Dinarello CA, Schrier RW. 2001. Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. *Kidney Int*, 59 (6):2243-2249.
- Kockara A, Kayatas M. 2013. Renal cell apoptosis and new treatment options in sepsis-induced acute kidney injury. *Ren Fail*, 35 (2):291-294.
- Kolch W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (11):827-837.
- Laesser M, Oi Y, Ewert S, Fandriks L, Aneman A. 2004. The angiotensin II receptor blocker candesartan improves survival and mesenteric perfusion in an acute porcine endotoxin model. *Acta Anaesthesiol Scand*, 48 (2):198-204.
- Levy MM, FM, Marshall JC, et al. . 2003. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29:530-538.
- Li D, Roberts R. 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58 (14):2085-2097.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414 (6863):550-554.
- Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. 1995. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*, 23 (10):1638-1652.
- Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P, Metzen E. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its

- degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*, 381 (Pt 3):761-767.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, 20 (18):5197-5206.
- Maxwell PH. 2005. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*, 90 (6):791-797.
- May CN, Ishikawa K, Wan L, Williams J, Wellard RM, Pell GS, Jackson GD, Bellomo R. 2012. Renal bioenergetics during early gram-negative mammalian sepsis and angiotensin II infusion. *Intensive Care Med*, 38 (5):886-893.
- Mayer P. 1891. Ueber das Farben mit haematoxylin. . *Mitt Zool Stat Neapel*, 10:170-186.
- Mehta RL, Bouchard J, Soroko SB, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM, Himmelfarb J. 2010. Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: Program to Improve Care in Acute Renal Disease. *Intensive Care Med*, 37 (2):241-248.
- Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Hoffmann A, Witte I, Mackenzie C, Baldus SE, Windolf J, Logters TT. 2012. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care*, 16 (4):R137.
- Minamishima YA, Moslehi J, Padera RF, Bronson RT, Liao R, Kaelin WG, Jr. 2009. A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol*, 29 (21):5729-5741.
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. 2005. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*, 365 (9466):1231-1238.
- Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115 (3):610-621.
- Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PS, Craig L, Hu X, Star RA. 2002. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int*, 62 (5):1601-1610.
- Murray MJ, Coursin DB. 1993. Multiple organ dysfunction syndrome. *Yale J Biol Med*, 66 (5):501-510.
- Nakayama K. 2009. Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J Biochem*, 146 (6):757-765.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371 (6495):297-300.
- Ostermann M, Chang RW. 2007. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med*, 35 (8):1837-1843; quiz 1852.
- Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. 2005. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol*, 16 (10):3046-3052.
- Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. 2004. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*, 43 (3):405-414.
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS. 1992. Serum Creatinine as an Index of Renal-Function - New Insights into Old Concepts. *Clinical Chemistry*, 38 (10):1933-1953.
- Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol*, 178 (12):7516-7519.
- Reinhart K BF. 2010. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis - 1. Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) un der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Georg Thieme Verlag KG.
- Remick DG, Ward PA. 2005. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*, 24 Suppl 1:7-11.

- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13 (2):110-116.
- Remuzzi G, Bertani T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*, 339 (20):1448-1456.
- Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. 2005. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, (99):S57-65.
- Ricci Z, Cruz D, Ronco C. 2009. The RIFLE classification for acute kidney injury definition. *Am J Surg*, 198 (1):152-153.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10 (3):321-329.
- Rüster C, Wolf G. 2006. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 17 (11):2985-2991.
- sabiosciences. 2014. Genkarte EGLN3/PHD3. URL: <http://www.sabiosciences.com> (Stand: 07.01.2014)
- Salgado DR, Rocco JR, Silva E, Vincent JL. 2010. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach? *Expert Opin Ther Targets*, 14 (1):11-20.
- Sayer R, Brown CDA. 2006. Characterisation of creatinine secretion across monolayers of mouse proximal tubule cells. *Faseb Journal*, 20 (5):A1226-A1226.
- Schaller MD, Waeber B, Nussberger J, Brunner HR. 1985. Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. *Am J Physiol*, 249 (6 Pt 2):H1086-1092.
- Schottmüller H. 1914. "Wesen und Behandlung der Sepsis," *Verhandl dt Kongress Inn Med* 31:;257-280.
- Schrier RW, Wang W. 2004. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*, 351 (2):159-169.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7 (1):77-85.
- Semenza GL. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5):588-594.
- Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3 (10):721-732.
- Semenza GL, Wang GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12 (12):5447-5454.
- Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (13):5680-5684.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 24 (5):181-185.
- Springer S. 2013. Akutes Nierenversagen. URL: www.springer.com (Stand: 06.08.2013).
- Stahr A, Frahm C, Kretz A, Bondeva T, Witte OW, Wolf G. 2012. Morg1(+/-) heterozygous mice are protected from experimentally induced focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1482:22-31.
- Stiehl DP, Wirthner R, Koditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. 2006. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem*, 281 (33):23482-23491.
- Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH. 2006. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor α levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol*, 26 (22):8336-8346.
- Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH. 2008. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood*, 111 (6):3229-3235.
- Thijs A, Thijs LG. 1998. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int Suppl*, 66:S34-37.

- Tian H, McKnight SL, Russell DW. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11 (1):72-82.
- Tuckerman JR, Zhao Y, Hewitson KS, Tian YM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. 2004. Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett*, 576 (1-2):145-150.
- van der Veen AH, Seynhaeve AL, Breurs J, Nooijen PT, Marquet RL, Eggermont AM. 1999. In vivo isolated kidney perfusion with tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumour-bearing rats. *Br J Cancer*, 79 (3-4):433-439.
- van Schaik SM, Abbas AK. 2007. Role of T cells in a murine model of Escherichia coli sepsis. *European Journal of Immunology*, 37 (11):3101-3110.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):RESEARCH0034.
- Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ. 2004. Modular construction of a signaling scaffold: MORF1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (18):6981-6986.
- Wahl HG IH, H Renz. 2003. Sepsis und Sepsismarker – Update. *J Lab Med* 27(11/12):431-439.
- Walmsley SR, Chilvers ER, Thompson AA, Vaughan K, Marriott HM, Parker LC, Shaw G, Parmar S, Schneider M, Sabroe I, Dockrell DH, Milo M, Taylor CT, Johnson RS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Carmeliet P, Whyte MK. 2011. Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice. *J Clin Invest*, 121 (3):1053-1063.
- Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S, Ivashchenko Y, Wagner I, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU. 2003. Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J*, 17 (9):1186-1188.
- Werdan K. 2009. Sepsis. *Internist - Springer Medizin Verlag*, 50:777–778.
- Wolf G. 1998. Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 24 (2-3):174-180.
- Wolf G. 2005. Role of Reactive Oxygen Species in Angiotensin II-Mediated Renal Growth, Differentiation, and Apoptosis. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 7 (9&10):1337-1345.
- Wolf G. 2006. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int*, 70 (11):1914-1919.
- Wolf G, Wenzel UO. 2004. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension*, 43 (4):693-698.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. 2003. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol*, 93 (1):P3-13.
- Wouters BG, Koritzinsky M. 2008. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8 (11):851-864.
- Yasuda H, Yuen PS, Hu X, Zhou H, Star RA. 2006. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int*, 69 (9):1535-1542.
- Yoshioka T, Rennke HG, Salant DJ, Deen WM, Ichikawa I. 1987. Role of abnormally high transmural pressure in the permselectivity defect of glomerular capillary wall: a study in early passive Heymann nephritis. *Circ Res*, 61 (4):531-538.
- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. 2001. Dynamic, site-specific interaction of hypoxia-inducible factor-1alpha with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res*, 61 (10):4136-4142.
- Yu X, Fang Y, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, Jiang S, Ding X. 2012. The balance of beneficial and deleterious effects of hypoxia-inducible factor activation by prolyl hydroxylase inhibitor in rat remnant kidney depends on the timing of administration. *Nephrol Dial Transplant*, 27 (8):3110-3119.

- Zahedi K, Wang Z, Barone S, Prada AE, Kelly CN, Casero RA, Yokota N, Porter CW, Rabb H, Soleimani M. 2003. Expression of SSAT, a novel biomarker of tubular cell damage, increases in kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284 (5):F1046-1055.
- Zarjou A, Agarwal A. 2011. Sepsis and acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 22 (6):999-1006.
- Zhou H, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. 2006. Acute Kidney Injury Biomarkers - Needs, Present Status, and Future Promise. *Nephrol Self Assess Program*, 5 (2):63-71.

8. Anhang

8.1 Tabellen

Kriterien	
I. Nachweis der Infektion	- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
II. Systemic inflammatory Host Response (SIRS) → mind. 2 Kriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder intravesikale Messung - Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ - Tachypnoe (Frequenz $\leq 20/\text{min}$) ohne Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$) - Leukozytose ($\geq 12000 / \text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000 / \text{mm}^3$) oder $\geq 10 \%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild
III. Akute Organdysfunktion → mind. 1 Kriterium	<ul style="list-style-type: none"> - Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz Desorientiertheit, Unruhe, Delirium - Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 h oder Thrombozytenzahl $\leq 100000 / \text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein. - Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa} (\leq 75 \text{ mmHg})$ unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa} (\leq 250 \text{ mmHg})$ unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein. - Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5 \text{ ml} / \text{kg} / \text{h}$ für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2\text{x}$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches. - Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\text{x}$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
<p>Sepsis: Kriterium I und II schwere Sepsis: Kriterium I, II und III septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 h ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck von $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendige Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den arterielle Mitteldruck $\geq 65 \text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.</p>	

Tabelle 1: Diagnose Kriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz-Kriterien [ACCP/SCCM 1992] [Hagel S. 2011].

Klasse	Glomerulusfiltrationsrate (GFR) Kriterien	Urinausscheidung (UA) Kriterien
Risk	1,5fach erhöhtes Serum-Kreatinin oder GFR-Erniedrigung von >25 %	UA < 0,5 ml / kg / h für 6 h
Injury	2fach erhöhtes Serum-Kreatinin oder GFR-Erniedrigung von >50 %	UA < 0,5 ml / kg / h für 12 h
Failure	> 3fach erhöhtes Serum-Kreatinin oder GFR-Erniedrigung von >75 % oder Serum-Kreatinin > 4 mg / dl mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5$ mg / dl	UA < 0,3 ml / kg / h für 24 h oder fehlende UA (Anurie) für 12 h
Loss	Dauerhaftes Nierenversagen > 4 Wochen	
End-stage kidney disease	Dauerhaftes Nierenversagen > 3 Monate	

Tabelle 2: RIFLE -Klassifizierung der „Acute Dialysis Quality Initiative“ (ADQI) definiert das Akute Nierenversagen [Bellomo et al. 2004, Ostermann und Chang 2007, Kellum et al. 2008, Kellum 2008, Ricci et al. 2009, Hoste et al. 2006]. Dieses Klassifikationssystem umfasst separate Kriterien für Kreatinin und UA. Der AKI-Patient erfüllt eines der Kriterien oder beide, wobei das schlechteste zur Klassifizierung genutzt wird.

Prärenales AKI	Intrarenales AKI	Postrenales AKI
Intravasaler Volumenmangel <ul style="list-style-type: none"> - Blutung - Renale Volumenverluste (osmotische Diurese, Diabetes Insipidus etc.) - Gastrointestinale Flüssigkeitsverluste - „Third space“-Verlust: Verbrennung, - Peritonitis, Pankreatitis Reduzierte kardiale Pumpleistung <ul style="list-style-type: none"> - Globale Herzinsuffizienz - Kardiogener Schock - Perikardtamponade - Foudroyante Lungenembolie Periphere Vasodilatation <ul style="list-style-type: none"> - Gramnegative Sepsis - Antihypertensive Medikation - Anaphylaxis Erhöhter intrarenaler Gefäßwiderstand <ul style="list-style-type: none"> - Operation - Anästhesie - Hepatorenales Syndrom - Prostaglandininhibitoren, Vasokonstriktoren, (Cyclosporin A, Tacrolimus, Kontrastmittel) 	Vaskular <ul style="list-style-type: none"> - <i>Große Gefäße</i> <ul style="list-style-type: none"> o Nierenarterienstenose o beidseits Nierenvenenthrombose o Embolie o Operatives Abklemmen - <i>Kleine Gefäße</i> <ul style="list-style-type: none"> o Vaskulitis o Cholesterinembolien o Thrombotische Mikroangiopathien: HUS, TTP, Sklerodermiekrise, Maligne Hypertonie o Thrombotische Mikroangiopathie während der Schwangerschaft Glomerulär <ul style="list-style-type: none"> - <i>Lineare Immunkomplexe</i> <ul style="list-style-type: none"> o Goodpasture-Syndrom o Renale Anti-GBM-GN - <i>Granuläre Immunkomplexe</i> <ul style="list-style-type: none"> o Akute postinfektiöse GN o Lupus-Nephritis o Endokarditis o IgA GN o Henoch-Schonlein-Purpura o Membranoprolif. GN - <i>Keine Immunkomplexe</i> <ul style="list-style-type: none"> o Wegener-Granulomatose 	Bilaterale Ureterobstruktion <ul style="list-style-type: none"> - <i>Intraureteral</i> <ul style="list-style-type: none"> o Steine o Koagel o Infektdetritus oder nekrotisch abgegangene Papillen o Wandödem nach Katheterisierung - <i>Extraureteral</i> <ul style="list-style-type: none"> o Prostata-, Blasen- oder Zervixkarzinom o Retroperitonealfibrose o Akzidentelle Ureterligatur oder traumatische Läsion des Ureters Blasenhalsobstruktion <ul style="list-style-type: none"> - Prostatahypertrophie - Prostata- oder Blasenkarzinom - Autonome Neuropathie - Gabe von Ganglionblockern (z.B. Clonidin, Guanfacin, Moxonidin) Urethralobstruktion <ul style="list-style-type: none"> - Urethralklappen - Urethralstrikturen

<p>Abfall des intraglomerulären Drucks</p> <ul style="list-style-type: none"> - ACE-Hemmer 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Panarteritis nodosa ○ Idiopathische rapid progressive GN <p>Interstitiell</p> <ul style="list-style-type: none"> - Akute bakterielle interstitielle Nephritis - Nephritis - Akute medikamenten-induzierte interstitielle Nephritis <p>Akute Tubulusnekrose</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Renale Ischämie</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Schock ○ Blutung ○ Trauma ○ Gramnegative Sepsis ○ Pankreatitis ○ Postpartale Blutung - <i>Nephrotoxische Medikamente</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Antibiotika, Zytostatika, Kontrastmittel, Lösungsmittel, Ethylenglykol, Anästhetika - <i>Endogene Toxine</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Myoglobin ○ Hämoglobin ○ Harnsäure 	
--	--	--

Tabelle 3: Ursachen des AKI [Springer 2012].

8.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnose Kriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz-Kriterien	XVI
Tabelle 2:	RIFLE -Klassifizierung der „Acute Dialysis Quality Initiative“ (ADQI) definiert das Akute Nierenversagen	XVII
Tabelle 3:	Ursachen des AKI	XVIII
Tabelle 4:	Primäre Antikörper.	17
Tabelle 5:	Sekundäre Antikörper.	18
Tabelle 6:	Primersequenzen.	18
Tabelle 7:	Primersequenzen.	19
Tabelle 8:	Versuchstiere der Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor.	20
Tabelle 9:	Versuchstiere der Untersuchungsgruppe PHD-Inhibitor-Survival.	20
Tabelle 10:	Versuchstiere der Untersuchungsgruppe RAAS.	20
Tabelle 11:	Mikrobiologische Untersuchung der Stuhlprobe	22
Tabelle 12:	Klinischer Schweregrad (CSS).	25
Abb. 1	Säugerniere mit funktioneller Einheit der Niere.	7
Abb. 2	HIF-1 α -Signalweg.	10
Abb. 3:	Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.	14
Abb. 4:	Experimenteller Versuchsablauf.	22
Abb. 5:	CLP-Operation.	23
Abb. 6:	Semi-Dry Western Blot.	32
Abb. 7:	Real-Time PCR Protokoll.	34
Abb. 8:	<i>Hif-1α</i> - und <i>Hif-2α</i> -Genexpression.	36
Abb. 9:	Renale Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α	38
Abb. 10:	<i>Morg1</i> - und <i>Phd3</i> -Genexpression.	39
Abb. 11:	Renale Proteinexpression von MORG1 und PHD3.	40
Abb. 12	HIF-1 α - und MORG1-Proteinspiegel im Nierengewebe.	41
Abb. 13:	<i>Glut1</i> -, <i>Epo</i> - und <i>Vegf</i> -Genexpression.	42
Abb. 14:	EPO- und VEGF-Spiegel im Blutplasma.	43
Abb. 15:	Pro- und antiinflammatorische Zytokine.	45
Abb. 16	Zytokin-Genexpression.	46
Abb. 17:	<i>Tnfa</i> -Genexpression.	47
Abb. 18:	Renale Proteinexpression von TNF α	48
Abb. 19:	CD3-Färbung im Nierengewebe.	49
Abb. 20:	PAS-Reaktion.	50
Abb. 21:	TUNEL-Assay.	52
Abb. 22:	Aktive Caspase 3.	53
Abb. 23:	Klinischer Schweregrad (CSS).	54
Abb. 24:	Effekte der Sepsisinduktion auf Metabolismusparameter im Blutplasma.	55
Abb. 25:	Nierenretentions- und Nierenschädigungsmarker.	56
Abb. 26:	ACR und NGAL-CR im Urin.	57
Abb. 27:	Überlebenskinetik/Survivalstudie.	58
Abb. 28:	Klinischer Schweregrad (CSS).	60
Abb. 29:	„Kleines“ Blutbild.	62
Abb. 30:	Effekte der Sepsisinduktion auf Metabolismusparameter im Blutplasma.	63
Abb. 31:	Nierenretentions- und Nierenschädigungsmarker.	65

Abb. 32: Albumin-Kreatinin-Ratio.....	65
Abb. 33 PAS-Reaktion.....	66
Abb. 34: Aktive Caspase 3.	68
Abb. 35: <i>Hif-1α</i> - und <i>Hif-2α</i> -Genexpression.	69
Abb. 36: Renale Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α	71
Abb. 37: <i>Morg1</i> - und <i>Phd3</i> -Genexpression.....	72
Abb. 38: MORG1- und PHD3-Proteinexpression.	74
Abb. 39: <i>Glut1</i> -, <i>Epo</i> - und <i>Vegf</i> -Genexpression.....	75
Abb. 40: EPO- und VEGF-Spiegel im Blutplasma.....	76
Abb. 41: <i>Tnfa</i> - und <i>Il-1β</i> -Genexpression.....	77
Abb. 42: Renale Proteinexpression von TNF α	78
Abb. 43: CD3-Färbung im Nierengewebe.....	79

Posterpräsentationen

6.-9. Okt. 2012

DGfN Kongress 2012 in Hamburg, Deutschland
Influence of PDH-inhibition in sepsis induced renal
Schindler, K., Schindler, C., Bondeva, T., Wolf, G.

23./24. Nov. 2012

Jahrestagung Thüringer Internisten 2012 in Jena,
Deutschland
Influence of PDH-inhibition in sepsis induced renal
Schindler, K., Schindler, C., Bondeva, T., Wolf, G.

4.-6. Sep. 2013

Weimar Sepsis Update 2013 in Weimar, Deutschland
Influence of PDH-inhibition in sepsis induced renal
Schindler, K., Schindler, C., Bondeva, T., Wolf, G.

Publikationen

In Vorbereitung

Influence of prolyl-hydroxylases-inhibition in sepsis in-
duced renal injury.
Schindler, K., Schindler, C., Bondeva, T., Claus, R., Wolf, G.

In Vorbereitung

Role of HIF-1 α and Morg1 in sepsis induced renal injury.
Schindler, C., **Schindler, K.**, Bondeva, T., Claus, R., Wolf, G.

In Vorbereitung

Consequences of HIF-1 α activation and Morg1 down-
regulation for renal injury in pre-existing chronic kidney
disease with superimposed sepsis: analysis of a two-
stage mouse model.
Schindler, C., **Schindler, K.**, Bondeva, T., Wolf, G.

In Vorbereitung

Role of the Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in
sepsis mediated renal inflammation: relationship to
HIF-1 α induced gene transcription.
Schindler, K., Schindler, C., Bondeva, T., Wolf, G.

Jena, den 07.04.2014

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: C. Schinder, Dr. T. Bondeva und Prof. Dr. G. Wolf, MHBA.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.5 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit und während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. G. Wolf, MHBA und Dr. T. Bondeva, sowie dem CSCC – „Center for Sepsis Control and Care“ bedanken, die mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Doktorarbeit am Universitätsklinikum Jena gegeben haben und die Begutachtung dieser Arbeit übernommen haben.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe und des CSCC's für ihre Hilfsbereitschaft danken. Im Besonderen bedanke ich mich bei Claudia Schindler, mit ihrer Zusammenarbeit konnte das vom CSCC unterstützte Projekt, welches Grundlage dieser Arbeit ist, realisiert werden.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Helmut Stauche, der mir in Computer- und Formfragen eine große Unterstützung war.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Stefan Schindler und meinen Eltern, sowie bei meinen Freunden bedanken, die mich fortwährend motiviert und unterstützt haben.